

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Estudio *in vitro* e *in vivo*  
de la función de la proteína  
adaptadora **Sur8**

Lara María Durá Pérez

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**Estudio *in vitro* e *in vivo* de la función  
de la proteína adaptadora Sur8**

LARA MARÍA DURÁ PÉREZ

Madrid, 2015



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Estudio *in vitro* e *in vivo* de la función  
de la proteína adaptadora Sur8**

LARA MARÍA DURÁ PÉREZ

Licenciada en Biología

Directores de Tesis:

DR. JOSÉ MARÍA ROJAS CABAÑEROS

DRA. NATALIA MARTÍNEZ ROMERO

Científico Titular de OPI

Científico Titular de OPI

Instituto de Salud Carlos III

Instituto de Salud Carlos III

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas (UFIEC), en el campus de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Madrid, 2015





El **Dr. José María Rojas Cabañeros** y la **Dra. Natalia Martínez Romero**, científicos titulares de OPI del Instituto de Salud Carlos III, dentro del laboratorio de Biología Celular perteneciente a la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas (UFIEC),

CERTIFICAN que: **Lara María Durá Pérez**, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado:

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la función de la proteína adaptadora Sur8”**

En nuestra opinión, éste trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Majadahonda (Madrid), a 15 de Enero de 2015.

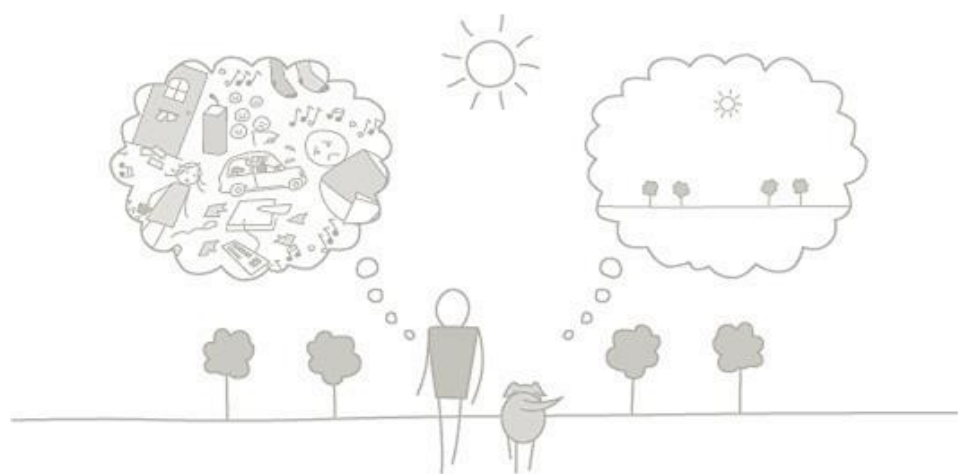
Fdo. DR. JOSÉ MARÍA ROJAS CABAÑEROS

Fdo. DRA. NATALIA MARTÍNEZ ROMERO

VºBº del Tutor: DR. ALBERTO MUÑOZ TEROL, Profesor de Investigación del CSIC









No puedo creer que haya llegado este día, por fin. Creo que la mejor forma de hacer balance es agradeciendo a todas esas personas que han hecho posible, de una forma u otra, que esta aventura comenzada con muchísima ilusión hace 5 años, quede plasmada en estas páginas:

En primer lugar, mi agradecimiento a mis directores de tesis: José María, gracias por darme la oportunidad de crecer mucho a nivel profesional, enseñarme a ser independiente, crítica y a descubrirme el mundo científico. Gracias por la confianza que has depositado en mí todos estos años y por plantearme un proyecto tan atractivo como tesis doctoral; Natalia, gracias por hacerte cargo de mí y de mi tesis, por ser una persona en la que confiar, a la que poder recurrir y que siempre me ha sabido apoyar en todos los aspectos. No menos importante, muchísimas gracias por los buenos momentos de risas. Gracias por tu máxima ayuda e involucración en la parte más bioquímica de la tesis.

Quiero aprovechar la ocasión para agradecer al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) la financiación que durante 4 años me ha permitido desarrollar este trabajo.

Continuaré por los que han sido mis compañeros en el laboratorio:

Berta, has sido un pilar esencial para llegar a conseguir esta tesis, que también es tuya. Sin tus ánimos y tu ilusión por descubrir no habría podido llegar tan lejos. Gracias por cuidarme e intentar sacar tiempo, entre tus obligaciones profesionales y personales, para ayudarme con este ambicioso proyecto.

Judith, de mayor quiero ser como tú. Eres equilibrio y objetividad. Muchas gracias por compartir mis ilusiones e implicarte en ellas. Me has ayudado mucho a intentar llevar mejor estos años de tesis pero siento no haber sido la mejor alumna jajaja. Gracias por estar siempre dispuesta y sacar tiempo para mí (espero que Martín no haya sufrido las consecuencias).

Mapi, gracias por enseñarme muchas cosas y tener tanta paciencia conmigo en muchos sentidos. Espero poder devolverte algo de la ayuda que me has prestado estos años. No puedo dejar de decirte que ¡piensa a lo grande porque a veces se te olvida que vales muchísimo personal y profesionalmente!

Dani, ¡muchas gracias por haber llegado con esas ganas de aprender y ese buen hacer! Fuiste un soplo de aire muy necesario para mí y que me ha ayudado mucho. Espero que tengas mucha suerte y no olvides que puedes contar conmigo para lo que quieras.

Vicky, eres guapa, buena, inteligente, siempre dispuesta a ayudar... ¡una joyita! Ojalá hubiésemos podido compartir más tiempo juntas. Espero que todo te vaya muy bien en todos los aspectos, te lo mereces.

Yolanda, has sido un gran fichaje para el laboratorio y me alegra haber podido coincidir contigo. Muchas gracias por todo. Te deseo mucha suerte en tu nueva aventura de mami de un chico jeje

Pepe, gracias por tu papel con los animales.

Natasha, te deseo mucha suerte en tu vuelta al labo. ¡Gracias por tu ayuda!

Encarni y Alberto, muchas gracias también por vuestro apoyo durante estos años. Espero que tengáis mucha suerte profesionalmente y que sigáis disfrutando de esos viajes tan estupendos.

Un agradecimiento especial a Silvia, excompi y ahora en el servicio de confocal, por ser tan buena profesional y tener esa actitud estupenda para escuchar, enseñar y hacer unos hijos tan guapos jajaja.

Ana, me alegra mucho haber sabido encontrarnos. Te deseo que seas muy feliz con esa familia tan bonita que estas formando.

Diana, *follow* a la *leader*! Es imposible empezar sin agradecerte el “saltamontes sin patas”, los momentos chonis con Camela, tus preciosas canciones... pero sobretodo, gracias por ese entusiasmo por aprender, por saber, por hacer las cosas bien. Siempre buscas superarte a ti misma y muy poca gente es tan valiente. Gracias por poner lo mejor de ti en este proyecto.

A la pareja del labo: Teresa, muchas gracias por ser una compañera tan alegre y detallista que siempre ha estado dispuesta a ayudarme con su experiencia, sus consejos y sus palabras de ánimo; Gonzalo, gracias por ser un gran profesor en los primeros meses en el laboratorio y por poner las bases sobre las que se ha construido parte de esta tesis. ¡Te deseo mucha suerte!

Carlota, todo lo que te pueda agradecer es poco. Siempre has estado y sigues estando, olvidándote de tus propios asuntos para hacer más fácil la vida a los que tienes cerca. Eres cariñosa, sincera, un apoyo incondicional y siempre piensas en lo que es mejor para mí ayudándome con consejos pero también empujándome a llevarlos a la acción. Te mereces lo mejor porque eres la mejor. ¡Muchas gracias por tu trabajo en el descubrimiento de qué puede estar haciendo nuestro querido Sur8 en el núcleo!

Por otro lado, muchas gracias al laboratorio del Dr. Alfredo Toraño con Merche, Inma, Sole, Ana... por ser unos vecinos fantásticos siempre disponibles para ayudarnos en lo que necesitemos y por tener siempre palabras de ánimo. Nunca se me olvidará la temperatura del nitrógeno líquido... lo siento...

También quería dar las gracias al ISCIII y a su personal con el que siempre he podido contar y que han intentado aportar todo lo mejor para conseguir sacar nuestro trabajo adelante: Dani y Tere del SPF, Raquel del animalario convencional, Raquel del servicio de histología, Fernando del servicio de confocal y César Eguiluz. Gracias también a otras personas como al Dr. Daniel López, Elena y Alejandro por conseguir que los tantísimos trayectos de bus en 5 años fuesen mucho más llevaderos. También a María, Cristina, a la Dra. Pilar Sánchez, Dra. Helena Mira, Dra. Isabel Liste y el Dr. Miguel Ángel Rodríguez, por

su ayuda. Un agradecimiento muy especial a mi querida Pepi, por sus ánimos y por preocuparse tanto de nuestro modular.

Además, quiero dar las gracias a la gente de prácticas que ha ido viniendo estos años (en especial a Nuria y a Laura) por el trabajo que han aportado y por darme la oportunidad de sentirme útil ayudando en su formación.

Por otro lado, quería agradecer a la Dra. Sagrario Ortega, al Dr. Miguel Lafarga y al Dr. Ignacio Casal, su importante colaboración en esta tesis. En especial, dar las gracias al Dr. Juan Guinea-Viniegra por enseñarme a trabajar con queratinocitos, con la piel, y por poder contar siempre con él. Muchas gracias por la paciencia que has tenido conmigo y espero que des tu visto bueno a este trabajo 😊

Gracias al Dr. Silvio Gutkind por la oportunidad de haber podido conocer un laboratorio del nivel del NIH y de haberme integrado como parte de su grupo durante 3 meses. Gracias en especial a Atsuko, Patricia, Juan Luis, Dani, Moraima, Ramiro y Alfredo por tratarme y cuidarme tan bien.

Durante este tiempo me he parado a pensar muchas veces en eso que dicen que en los momentos difíciles son pocas las personas con las que puedes contar, sin embargo en mi caso solo puedo dar las GRACIAS a todos porque siempre me he sentido muy muy arropada:

A mis amigas más y menos madrileñas Mara, Itsaso, Cova, Laura, Marta, Zita, Carmen y Laura-compi piso-, por estar tan pendientes de mí y hacer todo lo posible para ayudarme y animarme! Muchas gracias por ser tan buenas amigas! Sois la *crème de la crème* de los profesionales futuros!.

A mis hermosas Varinia y Mar, que no les ha importado que las molestase en cualquier momento y que, al verse también inmersas en el mundo de la tesis doctoral, me han sabido entender siempre, han sufrido conmigo y me han dado muchas fuerzas para continuar. Me siento muy orgullosa de mantener una amistad tan bonita como la que tenemos. Muchas gracias, chicas, ¡os debo unos cuantos daiquiris en Costa Rica!. Aprovecho para agradecerle al Dr. Fernando Salvador su ayuda esencial en esta tesis con protocolos y con su propia tesis... ¡miles de gracias!.

A mis amigos de siempre (Lour, Ester y Javier, Ana Pa, Raquel, Alba y Neus, Cris, Leo, Rafa...) por ayudarme a no perder el Norte, por interesarse en saber qué hago y tener palabras siempre de ánimo y apoyo.

Un especial agradecimiento para Gonzalo por ayudarme a llevar mejor este último año.

Ah! Gracias a *Spotify* por hacerme los días mucho más fáciles.

No quiero perder la oportunidad de acordarme de todos esos animales que hemos usado en este trabajo. Espero que, más tarde o más temprano, sirvan para aportar un pequeño granito al conocimiento científico.

Un agradecimiento muy muy especial a mi familia porque ha intentado siempre entender lo que hago, han sufrido conmigo conociendo la ilusión con la que siempre he hablado de la investigación y son los que más me han “obligado” a ver los esfuerzos que he hecho durante estos años y me han animado a ser valiente (aunque es más fácil serlo cuando sabes que ellos siempre están ahí). Quiero extender este agradecimiento a mi familia política, que me ha cuidado como la mía propia, interesándose siempre, con palabras de apoyo y con comida rica rica para llevar mejor las penas. ¡Qué gran suerte!

Por último, a David, que se ha atrevido a vivir conmigo en plena batalla (y que espero que siga queriendo después de esto...!). He tenido la mayor de las suertes por encontrar un amor intenso, sano, equilibrado y con muchas dosis de risas y magia. Sé que no hubiese continuado si no fuese por ti. Has sido mi mayor apoyo en todo, desde cosas de casa, hasta aguantarme las penas, recordarme qué soy y que no soy, hacer de pseudo-científico, sacarme una sonrisa... Te quiero mucho mucho mucho y espero, a partir de ahora, poder devolverte todo ese esfuerzo que has puesto para hacerme feliz pese a todo.







RESUMEN

ABSTRACT



La vía de señalización que componen las proteínas RAS/RAF/MEK/ERK regula aspectos celulares esenciales como la diferenciación, proliferación o migración celular, siendo una de las cascadas más desreguladas en cáncer. La función de los componentes de esta ruta está finamente regulada por una gran variedad de proteínas, entre las que se encuentran proteínas adaptadoras/andamio como Sur8, en la que se ha centrado nuestro trabajo. Sur8 (también denominada Shoc2) es una proteína conservada con repeticiones ricas en leucina que actúa como un regulador positivo de la cascada mediante su interacción con RAS, promoviendo la activación de RAF.

Con el objetivo de profundizar en la importancia de la función de Sur8 como regulador de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, en esta tesis doctoral hemos analizado su papel en diferentes procesos celulares, observando que la reducción en la expresión de Sur8 por silenciamiento génico, incrementa la adherencia y disminuye la proliferación de células HUVEC *in vitro*, afectando también a su viabilidad. Por otro lado, el silenciamiento de Sur8 en células HeLa reduce dramáticamente su movilidad celular inducida por diferentes estímulos. Siguiendo una aproximación proteómica, combinada con estudios bioquímicos y de microscopía, hemos identificado una posible nueva función de Sur8 en el núcleo celular relacionada con la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA.

Para el estudio de los efectos fisiológicos derivados de la supresión de Sur8 *in vivo*, hemos generado líneas de ratones KO condicionales con el exón 2 de *Sur8* flanqueado por secuencias LoxP y la recombinasa Cre bajo control de promotores específicos de tejido. El análisis de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>, KOs para Sur8 en epidermis, muestra como Sur8 es esencial para la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK en epidermis *in vivo*, ya que su delección resulta en hiperplasia epidérmica, alteraciones en el ciclo del pelo y una fuerte reacción inflamatoria, junto con una dramática disminución de la fosforilación de ERK. Además, los primeros resultados obtenidos en animales adultos KO constitutivos para Sur8 (Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2</sup><sup>T/+</sup>) tras tratamiento con tamoxifeno, muestran la aparición de fenotipos relacionados con un envejecimiento prematuro (encanecimiento, hipoactividad, aumento de peso...).

Estos nuevos modelos de ratón ofrecen la oportunidad de profundizar en los mecanismos moleculares y celulares por los cuales Sur8 puede regular distintos procesos *in vivo*. Además, el desarrollo de este estudio puede dar lugar a nuevas estrategias clínicas usando Sur8 como marcador o como diana terapéutica en el tratamiento de distintas patologías, incluyendo el desarrollo tumoral.



The signaling pathway RAS/RAF/MEK/ERK regulates essential cellular functions such as differentiation, proliferation or cell migration, and is one of the most dysregulated signaling cascades in human cancer. The function of the core proteins of this pathway is tightly regulated by a large variety of regulators including scaffold proteins like Sur8, the focus of our study. Sur8 (also called Shoc2), is a conserved leucine-rich repeats protein which acts as a positive regulator of this pathway through interaction with RAS, promoting RAF activation.

In order to study the importance of the role of Sur8 as a regulator of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway, in this thesis we have analyzed its role in various cellular processes, noting that the reduction in the expression of Sur8 by gene silencing, increases adhesion and decreases proliferation of HUVEC cells *in vitro*, affecting their viability. Furthermore, Sur8 silencing in HeLa cells dramatically reduces cell mobility induced by different stimuli. Following a proteomic approach, combined with biochemical and microscopy studies, we have identified a potential new function of Sur8 in the cell nucleus related to transcription and pre-mRNA processing.

To study the physiological effects derived from the lack of *Sur8* gene expression *in vivo*, we have generated several conditional KO mouse lines carrying exon 2 of *Sur8* gene flanked by LoxP sequences and a Cre recombinase under control of a tissue-specific promoters. The analysis of animals *Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-CRE<sup>T/+</sup>*, KOs for Sur8 in epidermis, shown that Sur8 is essential for the regulation of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway in epidermis *in vivo* because its deletion results in epidermal hyperplasia, alterations in the hair cycle and a strong inflammatory reaction, with a dramatic ERK phosphorylation decrease. Moreover, the first results obtained in constitutive KO adult animals (*Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup>*) after treatment with tamoxifen, shows the appearance of phenotypes associated with premature aging (graying, hypoactivity, increase of weight...).

The generation of these new mouse models provides an opportunity to clarify molecular and cellular mechanisms by which Sur8 could regulate different processes *in vivo*. Also, this knowledge can open new therapeutic strategies that employ Sur8 as a biomarker or therapeutic target in the treatment of various diseases, including tumor development.



# ÍNDICE





<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1. Las vías de señalización MAPK .....	9
2. La ruta RAS/RAF/MEK/ERK .....	10
2.1. Factores de crecimiento y Receptores con Actividad Tirosina Quinasa .....	10
2.1.1. Receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	11
2.1.2. Receptor del Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) .....	12
2.2. Familia de proteínas Ras (proteínas G monoméricas) .....	12
2.2.1. Distribución subcelular de las proteínas Ras .....	13
2.3. La proteína MAPKKK RAF, efector de Ras .....	14
2.3.1. Regulación funcional de RAF por procesos de fosforilación/desfosforilación .....	16
2.4. Proteínas MAPKK MEK1 y MEK2, principales efectores de RAF .....	17
2.5. Proteínas MAPK ERK1 y ERK2 .....	17
3. Patologías asociadas a la vía RAS/RAF/MEK/ERK .....	18
4. Regulación de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK por proteínas adaptadoras .....	20
4.1. Sur8: regulador positivo de la vía RAS/RAF/MEK/ERK .....	21
4.1.1. Estructura, distribución subcelular y mecanismo de acción .....	21
4.1.2. Función <i>in vivo</i> e implicación en patologías .....	23
5. La epidermis murina como modelo de estudio de la vía Ras/RAF/MEK/ERK .....	24
5.1. Estructura de la epidermis .....	25
5.1.1. Morfogénesis de la epidermis murina .....	26
5.2. Un anejo especializado de la epidermis: el folículo piloso .....	26
5.3. La vías RAS/RAF/MEK/ERK en epidermis .....	27
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
1. Plásmidos .....	37
1.1. Generación de mutantes .....	37
2. Cepas bacterianas .....	38
2.1. Transformación de bacterias competentes .....	38

3. Líneas celulares y cultivos primarios.....	38
3.1. Líneas celulares .....	38
3.2. Cultivo primario de queratinocitos de ratón .....	39
4. Ensayos bioquímicos <i>in vitro</i> .....	40
4.1. Transfecciones transitorias .....	40
4.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas .....	40
4.3. Silenciamiento génico por RNA de interferencia .....	40
4.4. Infección con adenovirus de queratinocitos primarios .....	41
4.5. Ensayo de activación transcripcional por medición de actividad Luciferasa .....	41
4.6. Separación membrana/citoplasma .....	41
4.7. Separación núcleo/citoplasma .....	42
4.8 Fraccionamiento de dominios de membrana en gradientes de sacarosa .....	42
5. Ensayos celulares <i>in vitro</i> .....	43
5.1. Ensayo de crecimiento de población .....	43
5.2. Ensayo “Click-it” para medir proliferación .....	43
5.3. Ensayo de adhesión .....	43
5.4. Ensayo de migración celular .....	43
6. Modelos de ratón.....	44
6.1. Generación del modelo genético de ratón KO condicional para <i>Sur8</i> .....	44
7. Extracción de DNA genómico y PCR de genotipado .....	45
8. Procedimientos <i>in vivo</i> .....	46
8.1. Administración de tamoxifeno .....	46
8.2. Administración de EdU para medir proliferación .....	47
9. Procesamiento de tejidos .....	47
9.1. Formación de bloques de parafina .....	47
9.2. Generación de bloques de OCT .....	47
9.3. Tinción con hematoxilina/eosina (H&E).....	48
10. Detección de proteínas .....	48
10.1. Preparación de extractos celulares y análisis de proteínas mediante WB.....	48
10.2. Análisis por inmunofluorescencia (IF) .....	49

10.3. Análisis por inmunohistoquímica (IHQ) .....	50
10.4. Análisis proteómico por espectrometría de masas (EM) .....	51
11. Análisis de RNA mensajero .....	51
11.1. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA .....	52
11.2. Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	52
12. Análisis estadísticos.....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	55
1. Papel de Sur8 en diferentes procesos celulares .....	57
1.1. Sur8 es necesario para mantener la fosforilación de ERK inducida por factores de crecimiento .....	57
1.2. La depleción de Sur8 aumenta la capacidad de adherencia de células HUVEC ....	58
1.3. Sur8 interviene en el proceso de proliferación de células HUVEC .....	58
1.4. Sur8 es esencial para la migración inducida por diferentes estímulos en HeLa ....	60
2. Importancia de la localización subcelular de Sur8 .....	63
2.1. El mutante puntual Sur8 S2G no incrementa la fosforilación de ERK .....	63
2.2. Sur8 S2G se localiza principalmente en balsas lipídicas de membrana plasmática	66
2.3. Localización de Sur8 en el núcleo celular .....	68
2.3.1. Búsqueda de secuencias NLS y NES en Sur8 .....	69
2.3.2. Localización de Sur8 en los <i>speckles</i> nucleares .....	72
2.4. Sur8 podría desempeñar diversas funciones en el núcleo celular .....	73
3. Obtención del ratón KO condicional para Sur8 y sus líneas derivadas.....	75
4. Papel de Sur8 en el desarrollo y fisiología de la epidermis de ratón .....	78
4.1. Análisis de la eliminación de Sur8 en queratinocitos primarios derivados del ratón KO condicional Sur8 <sup>flox/flox</sup> .....	78
4.1.1. Sur8 influye positivamente en la progresión del ciclo celular de queratinocitos <i>in vitro</i> .....	79
4.1.2. La expresión de marcadores de diferenciación en queratinocitos primarios está regulada negativamente por Sur8 .....	80
4.1.3. Sur8 induce el aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias en queratinocitos <i>in vitro</i> .....	81
4.2. Caracterización fenotípica del ratón KO de Sur8 en epidermis .....	82
4.2.1. Los animales Sur8 <sup>flox/flox</sup> ;K5-Cre <sup>T/+</sup> son de menor tamaño .....	85

4.2.2. Los animales deficientes en Sur8 poseen el pelo ondulado, seguido de una alopecia creciente .....	86
4.2.3. Los ratones Sur8 <sup>flox/flox</sup> ;K5-Cre <sup>T/+</sup> presentan hiperplasia en la epidermis .....	88
4.2.4. Inflamación epidérmica y hematopoyesis extramedular en los ratones KO para Sur8 en epidermis .....	92
4.2.5. Los animales Sur8 <sup>flox/flox</sup> ;K5-Cre <sup>T/+</sup> presentan anomalías oculares ...	94
5. Influencia de Sur8 en el mantenimiento de la homeostasis del organismo adulto .....	96
5.1 La eliminación de Sur8 provoca la aparición prematura de fenotipos relacionados con envejecimiento .....	98
6. Estudio de la expresión de Sur8 en muestras humanas de Carcinomas de células escamosas (SCC) y Psoriasis .....	101
<b>DISCUSIÓN</b> .....	105
1. Sur8 es necesario para mantener la fosforilación de ERK inducida por factores de crecimiento y para regular procesos de adherencia, proliferación y migración .....	107
2. La correcta función adaptadora de Sur8 depende de su localización subcelular .....	109
2.1 El cambio de localización del mutante Sur8 S2G, responsable de un tipo de síndrome de <i>Noonan</i> , no potencia la fosforilación de ERK como Sur8 wt .....	109
2.2 Sur8 en el núcleo celular podría desempeñar funciones relacionadas con la transcripción y el procesamiento del mRNA .....	112
3. La delección de Sur8 en la epidermis murina provoca alteraciones en los folículos pilosos, hiperplasia epidérmica, inflamación y anomalías oculares .....	113
3.1 El KO de Sur8 en epidermis presenta pelo rizado que degenera progresivamente .....	114
3.2 Hiperplasia epidérmica en los animales deficientes en Sur8 .....	115
3.3 El animal KO para Sur8 en epidermis presenta una inflamación generalizada .....	117
3.4 El KO de Sur8 en epidermis presenta crecimiento reducido y anomalías oculares .....	118
4. Influencia de la función de Sur8 en el mantenimiento de la homeostasis del organismo adulto .....	119
5. Expresión de Sur8 en muestras humanas de SCC y psoriasis .....	121
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	123
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	129
<b>ANEXOS</b> .....	153





# ABREVIATURAS





<b>AKT/PKB</b>	Proteína quinasa B ( <i>Protein kinase B</i> )
<b>BCC</b>	Carcinoma de células basales ( <i>Basal cell carcinoma</i> )
<b>CDK</b>	Quinasas dependientes de ciclinas ( <i>Cyclin-dependent kinases</i> )
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario ( <i>Complementary desoxy ribonucleic acid</i> )
<b>Cre<sup>ERT2</sup></b>	Recombinasa Cre cuya actividad es inducible por tamoxifeno, por fusión con una forma mutada del receptor de estrógenos.
<b>CS</b>	Suero de ternero bovino
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>ECM</b>	Matriz extracelular ( <i>Extracellular matrix</i> )
<b>EdU</b>	5-etinil-2'-desoxiuridina
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>ERK 1/2/5</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2/5</i>
<b>ESC</b>	Célula madre embrionaria ( <i>Embryonic stem cell</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast growth factor receptor</i> )
<b>Flox</b>	Abreviatura de <i>flanked by loxP</i> : región crítica de un gen diana con secuencias loxP a cada lado que serán reconocidas por la Cre recombinasa.
<b>FLP</b>	Enzima recombinasa <i>Flipase</i>
<b>FS</b>	Suero bovino fetal
<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad GTPasa ( <i>GTPase-activating protein</i> )
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina ( <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas ( <i>GTP coupled receptor</i> )
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>HEK 293T</b>	Células embrionarias de riñón humano ( <i>Human embryonic kidney</i> )
<b>HeLa</b>	Células de Henrietta Lacks
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical ( <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> )
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación

<b>IRS</b>	Vaina radicular interna ( <i>inner root sheath</i> )
<b>JNKs</b>	<i>Jun amino-terminal kinases</i>
<b>K 1/5/6/10/14</b>	Queratinas 1/5/6/10/14 ( <i>Keratin 1/5/6/10/14</i> )
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>KO-First</b>	<i>KO-First-Reported Tagged Insertion</i>
<b>KSF</b>	<i>Keratinocyte-serum free media</i>
<b>KSR</b>	<i>Kinase suppressor of Ras</i>
<b>LRR</b>	Dominio rico en repeticiones de leucina ( <i>Leucine-rich repeats</i> )
<b>MAPK</b>	proteínas quinasas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MAPKK</b>	MAP quinasa quinasa ( <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> )
<b>MAPKKK</b>	MAP quinasa quinasa quinasa ( <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> )
<b>MEM</b>	<i>Minimun essential media</i>
<b>MTOC</b>	Centro organizador de microtúbulos ( <i>Microtubule-organizing center</i> )
<b>NEO</b>	Neomicina
<b>NES</b>	Secuencia de exportación nuclear ( <i>Nuclear exportation sequence</i> )
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso ( <i>Nerve growth factor</i> )
<b>NLS</b>	Secuencia de localización nuclear ( <i>Nuclear localization sequence</i> )
<b>O/N</b>	<i>Overnight</i>
<b>OCT</b>	Temperatura óptima de corte ( <i>Optimal cutting temperature</i> )
<b>ORS</b>	Vaina radicular externa ( <i>Outer root sheath</i> )
<b>P38</b>	<i>Stress-activated protein kinases</i>
<b>PAK1</b>	<i>p21-activated kinase 1</i>
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear asociado a células proliferativas ( <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> )
<b>PP1</b>	Proteína fosfatasa 1 ( <i>Protein phosphatase 1</i> )
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2A ( <i>Protein phosphatase 2A</i> )
<b>qRT-PCR</b>	PCR reversa cuantitativa
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RTK</b>	Receptor con actividad tirosina quinasa ( <i>Receptor tyrosine kinase</i> )
<b>S1P</b>	Esfingosina-1-fosfato ( <i>Sphingosine-1-phosphate</i> )
<b>SCC</b>	Carcinoma de células escamosas ( <i>Squamous cell carcinoma</i> )
<b>SDF-1</b>	Factor 1 derivado de células del estroma ( <i>Stromal cell-derived factor-1</i> )
<b>SH 2/3</b>	Dominio 2/3 de homología a Src
<b>siRNA</b>	<i>Small/short interfering RNA</i>
<b>snRNPs</b>	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas ( <i>Small nuclear ribonucleic particles</i> )
<b>snoRNPs</b>	Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas ( <i>Small nucleolar ribonucleic particles</i> )

<b>SPF</b>	Animalario libre de patógenos específicos ( <i>Specific pathogen free</i> )
<b>Sur8/Shoc2</b>	Supressor of Ras mutation 8
<b>Sur8<sup>Δep</sup></b>	Delección específica de Sur8 en queratinocitos epidérmicos
<b>T/+</b>	Contiene el transgén que codifica la Cre recombinasa
<b>TGFα</b>	Factor de crecimiento transformante α ( <i>Transforming growth factor</i> )
<b>TST</b>	<i>Tail suspension test</i>
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral α ( <i>Tumor necrosis factor α</i> )
<b>TSLP</b>	Linfopoyetina estromal tímica ( <i>Thymic stromal lymphopoietin</i> )
<b>UBC</b>	Ubiquitina C
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>WB</b>	<i>Western-blot</i>
<b>wt</b>	<i>Wild-type</i>



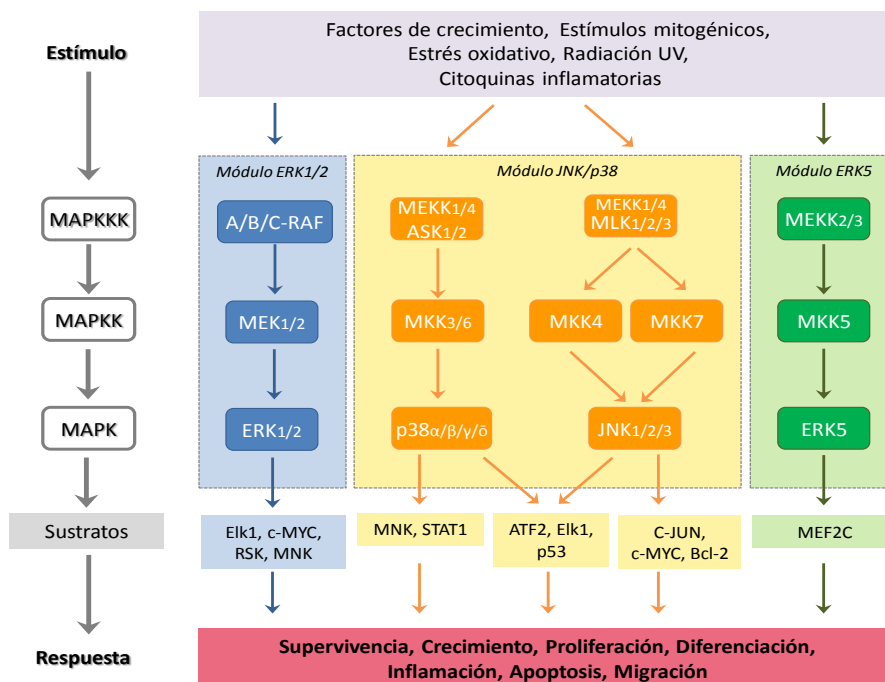
# INTRODUCCIÓN



## 1. LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPK

Las células de nuestro organismo, a lo largo de la vida, se exponen a una gran cantidad de estímulos externos que favorecen distintas respuestas celulares. Las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), muy conservadas entre los eucariotas, son claves para inducir una amplia variedad de respuestas celulares como las de supervivencia, crecimiento, proliferación, diferenciación, migración, senescencia y apoptosis. Asimismo, las MAPKs juegan un papel muy importante en diferentes patologías, incluyendo el cáncer.

En mamíferos, diferenciamos tres familias de MAPKs: JNKs (*Jun amino-terminal kinases*), p38 (*Stress-activated protein kinases*) y ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) (Fig. I-1). El módulo JNK se activa por estrés ambiental (radiación ionizante, calor, estrés oxidativo y daño al DNA) y citoquinas inflamatorias, así como por factores de crecimiento. Ejerce un importante papel en la apoptosis, en la inflamación y en el metabolismo celular (Weston and Davis, 2007). Del mismo modo que JNK, el módulo p38 se activa intensamente por estrés ambiental y citoquinas inflamatorias, contribuyendo en procesos de inflamación, apoptosis, diferenciación y control del ciclo celular (Ono and Han, 2000). Por otro lado, la familia ERK puede dividirse en las clásicas ERK1/2 y otras ERK como ERK5. La vía de señalización de ERK1/2 responde a factores de crecimiento y mitógenos, induciendo respuestas relacionadas con crecimiento celular y diferenciación, entre otras (Morrison, 2012).



**FIGURA I-1. FAMILIA DE LAS MAPKS.** Esquema de la señalización de las principales quinasas que componen esta familia. La llegada de diferentes estímulos, posibilita la activación de una serie de quinasas que fosforilan en cadena a otras quinasas hasta activar a las MAPK: ERK1/2, p38/JNK y ERK5. La fosforilación de sustratos citosólicos y nucleares desencadenará distintas respuestas celulares.

La Figura I-1 resume el funcionamiento de las vías MAPK clásicas: la llegada de estímulos a la superficie celular, desencadena la activación de una cascada de fosforilaciones que comienza con las proteínas MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK, MEKK o MAP3K), que fosforilarán a su vez las proteínas MAP quinasa quinasa (MAPKK, MEK) y que, por último, activarán a la correspondiente MAPK por fosforilación de la secuencia conservada TXY (treonina-X-tirosina), aunque también existen otras MAPK atípicas en las que no aparece este motivo. Una vez activadas, las MAPK activarán por fosforilación a proteínas diana en el citosol y en el núcleo, donde su translocación regulará la transcripción de determinados genes, dando lugar a una respuesta celular concreta (Morrison, 2012).

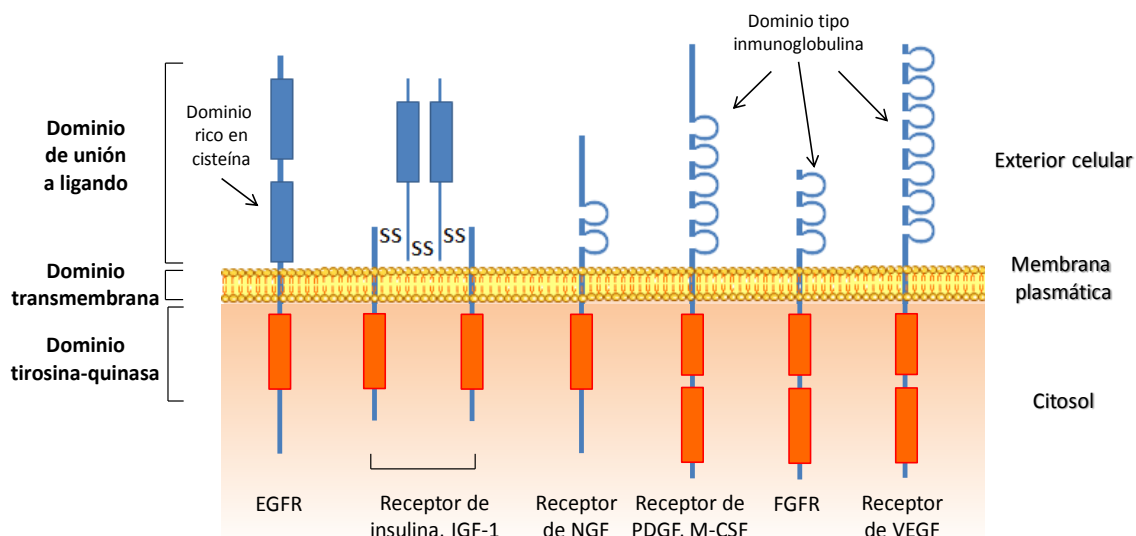
## 2. LA RUTA RAS/RAF/MEK/ERK

La ruta de señalización para activar ERK1/2 es, actualmente, la mejor caracterizada de las vías MAPK. Desempeña un papel esencial en el control de la proliferación y diferenciación celular en condiciones fisiológicas, por lo que fallos en su funcionamiento contribuyen a la aparición de diversas patologías y a la progresión tumoral (Dhillon *et al.*, 2007). Por esta razón, esta ruta ha sido y sigue siendo, objeto de numerosas investigaciones para identificar componentes susceptibles de ser utilizados como dianas terapéuticas (Roberts and Der, 2007).

### 2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA

La ruta canónica de activación de ERK, RAS/RAF/MEK/ERK, es inducida por factores de crecimiento (FGF, EGF, VEGF, NGF), hormonas o citoquinas, que se unen a receptores de la superficie celular como los receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR) o integrinas, iniciando la cascada de activación. Concretamente, la familia de RTKs se caracteriza por poseer actividad tirosina quinasa intrínseca, a partir de la cual se activan distintas rutas de señalización. En su estructura diferenciamos un dominio extracelular al que se unirán los distintos ligandos, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático con la actividad tirosina quinasa (Fig. I-2). Tras la unión de ligandos específicos al dominio extracelular, se induce la dimerización de estos receptores, lo que estimula su actividad tirosina quinasa produciendo auto y trans-fosforilaciones de tirosinas de la región citoplasmática, que servirán como puntos de anclaje para proteínas implicadas en la vía RAS/RAF/MEK/ERK (Warren and Landgraf, 2006; McKay and Morrison, 2007).





**FIGURA I-2. ESTRUCTURA DE DIFERENTES SUBFAMILIAS DE RTKS.** Esquema de los dominios que conforman varios tipos de receptores de esta familia. Imagen modificada de Bruce et al., 5ªed. Biología molecular de la célula.

Por la implicación que tienen en nuestro estudio, nos centraremos particularmente en:

### 2.1.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Uno de los RTKs mejor caracterizados es el EGFR o ErbB1, glicoproteína integral de membrana de 170 kDa que pertenece a la familia de receptores ErbB (EGFR/ErbB-1, HER2/c-neu/ErbB-2, HER3/ErbB-3 y HER4/ErbB-4). Su activación se produce mediante la unión de ligandos específicos como EGF y TGF $\alpha$  (Factor de crecimiento transformante  $\alpha$ ), entre otros, y es clave para regular las funciones de una gran variedad de células y tejidos de origen ectodérmico o mesodérmico. La dimerización y activación del EGFR estimula su actividad tirosina quinasa intrínseca fosforilando varios residuos del dominio citoplasmático (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 y Y1173). También, en este dominio, existe una región con sitios de fosforilación serina/treonina, necesarios para modular la actividad del receptor. Las fosforilaciones en tirosina provocan la unión de proteínas de señalización que se asocian por dominios de unión a fosfotirosina de homología a Src (SH2), como la proteína GRB2 (van der Geer and Pawson, 1995; Koch *et al.*, 1991). Una vez unida al receptor, GRB2 interaccionará mediante dos dominios de homología a Src con regiones específicas ricas en prolina (SH3) (como las presentes en la proteína SOS), facilitando la activación de la GTPasa RAS, clave en la activación de la cascada RAF/MEK/ERK (Lowenstein *et al.*, 1992). Además, EGFR activo puede unir otras moléculas con dominios SH2 como Shc o la fosfolipasa C gamma. Las principales cascadas de transducción de señales inducidas por EGFR son RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT (AKT/PKB, Proteína quinasa B), lo que conlleva su implicación en procesos celulares tales como

proliferación, diferenciación, migración, adhesión y prevención/inducción de apoptosis (Zhang *et al.*, 2007). En diversos estudios con ratones deficientes en EGFR se muestra como, dependiendo del fondo genético, mueren durante la gestación por defectos en la placenta o sobreviven unos días tras el nacimiento (hasta el día 20 postnatal) presentando multitud de defectos en la piel, riñón, cerebro, hígado, hueso, tracto gastrointestinal y pulmones (Miettinen *et al.*, 1995; Sibia and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995)

### 2.1.2 Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR)

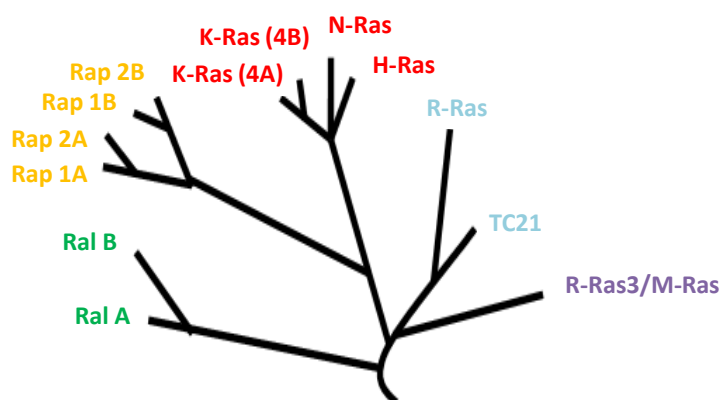
La familia FGFR consta de cuatro miembros (FGFR1-FGFR4). Todos ellos tienen una región extracelular con tres dominios de tipo inmunoglobulina a los que se unen los ligandos, una porción transmembrana en hélice- $\alpha$  y un dominio quinasa intracelular con la característica actividad tirosina quinasa (Fig. I-2). Estos receptores interactúan con la familia de ligandos FGF, compuesta por 22 miembros, poniendo en marcha una cascada de señales que influyen en la mitogénesis y la diferenciación celular de una gran variedad de células de origen mesenquimal, neuronal y epitelial. El FGFR2, uno de los FGFR más estudiados, presenta dos isoformas (FGFR2IIIb y FGFR2IIIc) generadas por *splicing* alternativo del exón correspondiente al tercer dominio tipo inmunoglobulina. El FGFR2IIIb se encuentra, predominantemente, en los tejidos ectodérmicos y en el revestimiento endotelial de los órganos (Ohuchi *et al.*, 2000; Petiot *et al.*, 2003). El FGFR2IIIc se encuentra en el mesénquima, incluyendo los huesos craneofaciales. Estas isoformas difieren en su unión a los diferentes FGFs: FGFR2IIIb se une a FGF 1/3/7/10/22, mientras que FGFR2IIIc se une a FGF 1/2/4/6/8/9/17/18. Una vez activados, estos receptores sirven de unión para proteínas adaptadoras, como FRS2, que continuarán con la cascada de señalización RAS/RAF/MEK/ERK. Están involucrados en numerosos procesos biológicos como cicatrización, hematopoyesis y angiogénesis (Eswarakumar *et al.*, 2005; Presta *et al.*, 2005). En los ratones *knock-out* (KO) para *Fgfr2* el desarrollo embrionario se interrumpe en el estadio 10.5 por problemas en la formación de la placenta y defectos múltiples en la organogénesis, que incluyen la ausencia de los primordios que darán lugar a las extremidades (Xu *et al.*, 1998).

## 2.2 FAMILIA DE PROTEÍNAS RAS (PROTEÍNAS G MONOMÉRICAS)

Un gran número de receptores de superficie celular o receptores de matriz extracelular (ECM) como las integrinas, transmiten sus señales a través de la familia de proteínas RAS para activar la cascada RAF/MEK/ERK. Las proteínas RAS son de pequeño tamaño y poseen actividad GTPasa intrínseca, aunque poco eficiente. Esta capacidad enzimática las hace oscilar entre su unión a GDP (estado inactivo), y su unión a GTP, estado en el que pueden unir y activar distintos efectores (Ehrhardt *et al.*, 2002). Sin embargo, se necesita la interacción

directa con proteínas reguladoras para que la velocidad de hidrólisis sea óptima. Las proteínas activadoras de la actividad GTPasa o GAPs (por ejemplo, p120GAP, NF1, GAP1-like) favorecen la hidrólisis de GTP a GDP, mientras que las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina o GEFs (como SOS, RAS-GRF, RAS-GRP) promueven el paso de RAS-GDP a RAS-GTP (Rojas *et al.*, 2012).

La subfamilia de proteínas RAS se divide en 5 grupos que engloban a 13 miembros (Fig. I-3). El primer grupo identificado se compone de 3 genes que codifican 4 proteínas de 21 kDa de masa molecular (H-RAS, N-RAS, K-RAS4A y K-RAS4B generadas por *splicing* alternativo). Los miembros de los otros grupos: M-RAS, TC21, R-RAS, RAP y RAL, comparten una identidad del 40-50% con las proteínas H-, N- y K-RAS (Wennerberg *et al.*, 2005).



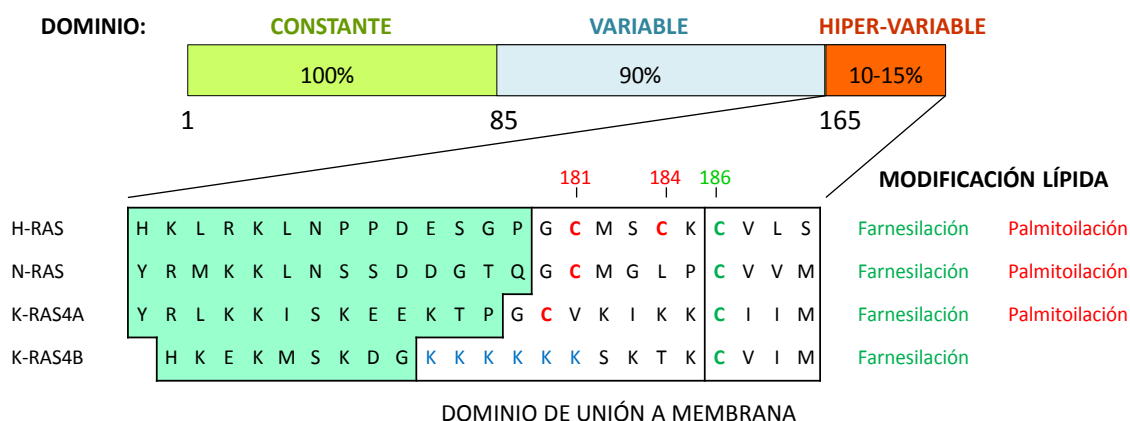
**FIGURA I-3. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LA SUBFAMILIA RAS.** Se muestran, en diferentes colores, los grupos en los que se divide la subfamilia de proteínas RAS. Imagen modificada de Ehrhardt *et al.*, 2002.

Estudios de disrupción génica en ratón demostraron que solo *K-Ras* es esencial para el desarrollo embrionario. Ratones deficientes en los genes *H-* y/o *N-Ras* nacen y crecen de forma normal (Umanoff *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 2001), mientras que los ratones sin *K-Ras* ven interrumpida su gestación a los 12-14 días debido a defectos cardíacos (Koera *et al.*, 1997). Sin embargo, la inserción de la secuencia del gen *H-RAS* humano bajo el promotor de *K-Ras*, recupera el desarrollo normal en los ratones KO para *K-Ras*, sugiriendo que las funciones de estas proteínas son solapantes durante el desarrollo embrionario (Johnson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Distribución subcelular de las proteínas RAS

Las isoformas de la subfamilia RAS comparten el 100% de identidad de aminoácidos en los primeros 85 residuos del extremo N-terminal y un 90% en la región intermedia, por lo que la región hipervariable en el extremo C-terminal es fundamental para definir las diferentes localizaciones de estas proteínas y sus diversas funciones (Fig. I-4) (Hancock, 2003). Las proteínas RAS pueden ejercer su función desde una gran variedad de membranas intracelulares debido a una serie de modificaciones lipídicas: en el retículo endoplasmático

(RE) tiene lugar la farnesilación de un residuo de cisteína conservado y en el aparato de Golgi tiene lugar una palmitoilación (excepto en el caso de K-RAS4B). Estas modificaciones, anclan diferencialmente a las isoformas RAS en diferentes microdominios de la membrana plasmática y sistemas de endomembranas (Prior and Hancock, 2001; Arozarena *et al.*, 2011; Plowman and Hancock, 2005).



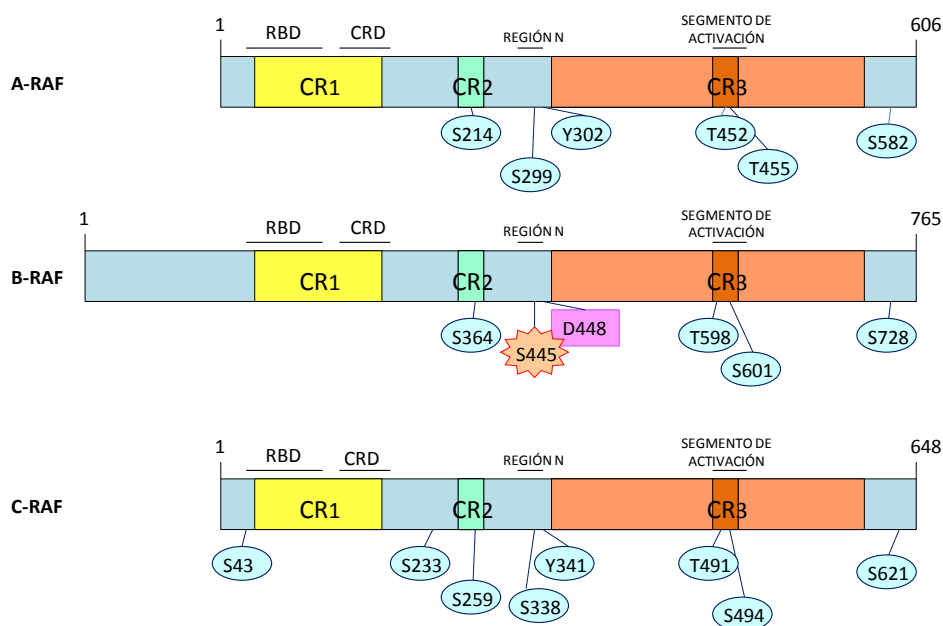
**FIGURA I-4. REGIÓN HIPERVARIABLE DE LAS PROTEÍNAS RAS Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.** En la imagen se muestra la secuencia de aminoácidos y los residuos clave que componen la región hipervariable de cada una de las isoformas RAS. También, se indican las modificaciones lipídicas que tienen lugar en cada una de ellas: farnesilación (residuos en color verde) y palmitoilación (residuos en color rojo). Imagen modificada de Prior and Hancock, 2001. En color azul se muestra el dominio polibásico rico en lisinas de K-RAS4B.

En la membrana plasmática, podemos encontrar a H-RAS en balsas lipídicas (región rica en esfingolípidos y colesterol) y en membrana desorganizada (enriquecida en lípidos como la fosfatidilcolina) (Prior *et al.*, 2003); N-RAS solo se detecta en balsas lipídicas no caveolares, y K-RAS4B se localiza exclusivamente en membrana desorganizada (Philips, 2005). Las proteínas H y N-RAS se dirigen a membrana plasmática a través del transporte vesicular. Sin embargo, K-RAS4B se desplaza directamente desde el RE a través de microtúbulos, gracias a la interacción de su dominio polibásico con la proteína del citoesqueleto tubulina (Chen *et al.*, 2000). En el sistema de endomembranas, encontramos estas proteínas en endosomas, RE, mitocondria y aparato de Golgi (Gomez and Daniotti, 2005; Philips, 2005; Rebollo *et al.*, 1999; Arozarena *et al.*, 2004).

Entre los principales efectores de RAS-GTP encontramos RAF, PI3K, RAL-GDS y TIAM-1, proteínas involucradas en el control de la proliferación, supervivencia, apoptosis y migración celular (Rajalingam *et al.*, 2007). Sin embargo, la distribución subcelular de las diferentes isoformas favorece su interacción con determinados efectores o reguladores, lo cual puede influir sobre el tipo, duración e intensidad de la señal mediada por RAS. Por ejemplo, K-RAS tiene preferencia por la unión a RAF, mientras que H-RAS favorece la activación de PI3K (Matallanas *et al.*, 2006).

### 2.3 LA PROTEÍNA MAPKKK RAF, EFECTOR DE RAS

Como hemos visto anteriormente, RAS-GTP es capaz de inducir la activación de distintas rutas de señalización entre las que se encuentra la vía RAF/MEK/ERK, a través de su interacción con la quinasa RAF. Las 3 isoformas descritas de RAF (A-RAF, B-RAF y C-RAF/RAF-1) poseen una estructura similar con tres zonas conservadas (Fig. I-5). En el extremo N-terminal, encontramos una región constituida por un dominio de unión a RAS y un dominio rico en cisteína (CR1), responsable del reclutamiento de RAF a la membrana, primer paso para su activación. La segunda zona (CR2) contiene sitios de unión a proteínas reguladoras y en el extremo C-terminal se encuentra la tercera región conservada con el centro catalítico (CR3). Entre CR2 y CR3 existe una región con carga negativa (Región N), la cual es crítica para la regulación de la actividad entre las distintas isoformas. Además, en las 3 isoformas, existen numerosos residuos no conservados sujetos a fosforilación que son claves para la modulación de las funciones de estas proteínas (Wellbrock *et al.*, 2004; O'Neill and Kolch, 2004).



**FIGURA I-5. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS RAF.** Las tres isoformas comparten regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. CR3 contiene el centro catalítico con el segmento de activación (naranja). Se destacan los sitios de fosforilación de cada isoforma. La serina 338 de C-RAF está conservada (S299 en A-RAF y S445 en B-RAF) pero está constitutivamente fosforilada en B-RAF (estrella roja). D448 (rectángulo rosa) y S445, son responsables de la alta actividad basal de B-RAF. CRD: dominio rico en cisteína. RBD: dominio de unión a RAS. Modificado de Wellbrock *et al.*, 2004.

Aunque todas las proteínas RAF pueden unir RAS y fosforilar a MEK1/2, la actividad y distribución de estas proteínas difiere según la isoforma: C-RAF (72-74 kDa) se expresa de forma ubicua; A-RAF (68 kDa) presenta la menor actividad quinasa, mostrando su expresión más elevada en órganos urogenitales; B-RAF genera, al menos, 10 proteínas diferentes (75-100 kDa) por *splicing* alternativo y es muy abundante en tejido neuronal (Barnier *et al.*, 1995). B-

RAF es la isoforma que induce mayor activación de ERK *in vivo* y destaca en cáncer por ser el gen *RAF* más mutado en tumores humanos (Emuss *et al.*, 2005). Además, B-RAF y C-RAF pueden interaccionar entre sí y, tras estimulación, es el heterodímero B-RAF/C-RAF quien presenta mayor actividad (Rushworth *et al.*, 2006). De hecho, algunas mutaciones encontradas en tumores favorecen la formación de estos heterodímeros B-RAF/C-RAF (Wellbrock *et al.*, 2004; Cseh *et al.*, 2014).

Además de las proteínas MEK1/2 como principales efectores, las serina/treonina quinasas RAF poseen otros sustratos. Se ha demostrado, por ejemplo, que C-RAF es capaz de activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Li and Sedivy, 1993), implicado en supervivencia celular. También, se han propuesto como sustratos de C-RAF la fosfatasa CDC25 (Galaktionov *et al.*, 1995) y la proteína del retinoblastoma Rb (Wang *et al.*, 1998), ambos reguladores del ciclo celular. Otros estudios relacionan C-RAF con apoptosis, por su unión con BAG-1 y BCL-2, proteínas anti-apoptóticas (Wang *et al.*, 1996). Por otro lado, uno de los efectores más interesantes de B-RAF es el propio C-RAF. Mutantes de B-RAF que son incapaces de activar MEK *in vitro*, si lo hacen *in vivo* estimulando la actividad de C-RAF (Wan *et al.*, 2004).

Estudios genéticos en modelos murinos han demostrado que las proteínas RAF desempeñan funciones no redundantes durante el desarrollo: ratones KO para A-RAF mueren a los 7-21 días después del nacimiento a causa de defectos gastrointestinales y neurológicos (Pritchard *et al.*, 1996). Los animales KO para B-RAF o C-RAF mueren en el estadio embrionario 10.5-12.5, en el caso de B-RAF por defectos vasculares que incluyen la apoptosis de células endoteliales diferenciadas y, en el caso de C-RAF, a causa de anomalías en la placenta y apoptosis en el hígado fetal (Wojnowski *et al.*, 1997; Mikula *et al.*, 2001).

### 2.3.1 Regulación funcional de RAF por procesos de fosforilación/desfosforilación

El proceso de activación de las isoformas RAF es complejo y comprende fenómenos de oligomerización, unión a otras proteínas, cambios conformacionales y procesos de fosforilación y desfosforilación que regulan su actividad (Marais *et al.*, 1995). En la Tabla I-1 y en la Figura I-5 anterior, se muestran las fosforilaciones que pueden regular positiva o negativamente la activación de C-RAF. En el caso de B-RAF, la serina 445 (S338 en C-RAF) está constitutivamente fosforilada y, junto con D448 y D449, contribuye a su alta actividad basal al quedar cargada negativamente dicha región de forma constitutiva (Mason *et al.*, 1999).

En la regulación de RAF también son importantes los fenómenos de desfosforilación. Las proteínas fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A) juegan un papel clave en la regulación positiva de la activación de RAF por desfosforilación de la serina 259 (Cohen, 2002; Raabe and Rapp, 2003). Esta modificación facilita el desplazamiento de la proteína reguladora 14-3-3 y permite la

unión entre RAS y C-RAF por el dominio de unión a RAS (Roy *et al.*, 1998; Jaumot and Hancock, 2001).

Regulación de C-RAF		Residuos/Posición	Enzimas implicadas	Referencias
FOSFORILACIONES	INHIBIDORAS	S43 S233 S259	Proteína quinasa A Proteína quinasa A Proteína quinasa A + AKT/PKB	Wellbrock <i>et al.</i> , 2004
	ACTIVADORAS	S338 Y341 T491 S494	P21-activated kinase1 (Pak1)? Src +quinasas de la familia <i>desconocida</i> <i>desconocida</i>	Zang <i>et al.</i> , 2002 Mason <i>et al.</i> , 1999
DESFOSFORILACIONES		S259	PP1 + PP2A	Cohen, 2002 Raabe&Rapp, 2003

**TABLA I-1. PRINCIPALES RESIDUOS CLAVES PARA LA REGULACIÓN DE C-RAF.** Resumen de las modificaciones por fosforilación y desfosforilación en aminoácidos importantes para la regulación de la actividad de RAF. También se indican las enzimas quinasas o fosfatasas responsables de estas modificaciones.

## 2.4 PROTEÍNAS MAPKK MEK1 Y MEK2, PRINCIPALES EFECTORES DE RAF

Las proteínas MEK pertenecen a una familia de quinasas con especificidad dual que fosforilan residuos de tirosina y de treonina. En células de mamífero, esta familia está compuesta por las proteínas MEK1 y MEK2 (45 kDa), con una homología de secuencia del 80% y que participan en la activación directa de ERK1/2 (Zheng and Guan, 1993). Para que las proteínas MEK se activen completamente se requiere la fosforilación de dos residuos de serina muy conservados en el domino de activación (S217 y S221 en MEK1, y S222 y S226 en MEK2), por proteínas RAF u otras MAPKKK (Alessi *et al.*, 1994). También es necesaria la fosforilación de la serina 298 de MEK1 por PAK1 (Coles and Shaw, 2002; Park *et al.*, 2007).

## 2.5 PROTEÍNAS MAPK ERK1 Y ERK2

Las proteínas ERK1 y ERK2 son serina/treonina quinasas de 44 y 42 kDa, respectivamente, con una homología del 83% en mamíferos. Ambas proteínas se expresan desde estadios tempranos del desarrollo en todos los tejidos y responden prácticamente a los mismos estímulos, compartiendo la mayoría de sus funciones. Sin embargo, estudios con ratones KO han mostrado diferencias entre las funciones que realiza cada una de ellas (Lloyd, 2006): los ratones KO para ERK1 son viables y fértiles, pero presentan alteraciones en la actividad locomotora, en la maduración de los timocitos y en la diferenciación de adipocitos (Bost *et al.*, 2005; Mazzucchelli *et al.*, 2002; Pagés *et al.*, 1999); por otro lado, los ratones deficientes en ERK2 muestran un fenotipo completamente distinto, quedando interrumpida su gestación entre los días 6.5-8.5 de desarrollo por fallos en la diferenciación del mesodermo y en el desarrollo placentario (Hatano *et al.*, 2003; Saba-El-Leil *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2003).

Hasta ahora, los únicos activadores conocidos de ERK son las proteínas MEK1/2, que interaccionan con el extremo C-terminal de ERK a través del dominio *common docking*, por el que interaccionan también proteínas fosfatasa específicas (Tanoue and Nishida, 2003). Para que ERK se active totalmente es necesaria la fosforilación de dos residuos de treonina y tirosina localizados dentro del dominio de activación: T202/Y204 en ERK1 y T185/Y187 en ERK2. Ambos residuos, separados por un ácido glutámico, se encuentran formando el motivo TEY (treonina-ácido glutámico-tirosina) (Ferrell and Bhatt, 1997). Tras su fosforilación, ERK dimeriza y puede actuar sobre diferentes sustratos citoplasmáticos o dirigirse al núcleo celular (Casar *et al.*, 2008). En el citoplasma puede fosforilar proteínas como MNK1/2, que a su vez fosforila a eIF-4E (Waskiewicz *et al.*, 1997; Waskiewicz *et al.*, 1999) o RSK, la cual se trasladará al núcleo donde fosforila factores de transcripción como el proto-oncogén c-FOS (Smith *et al.* 1999), SRF y CREB. Entre los sustratos nucleares de ERK1/2 se incluyen factores de transcripción como Elk-1 (Marais *et al.* 1993), c-MYC (Cole and Nikiforov, 2006) o c-FOS (Chuang and Ng, 1994), que regularán la expresión de muchos genes implicados en proliferación, diferenciación, supervivencia o migración (Roberts *et al.*, 2007). Muchos de estos sustratos poseen motivos de interacción específicos que facilitan su fosforilación por ERK. Además, ERK también es capaz de inducir la regulación negativa de proteínas implicadas en la ruta RAS/RAF/MEK, como EGFR o SOS (a través de RSK).

### 3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA VÍA RAS/RAF/MEK/ERK

Debido a las funciones que la ruta RAS/RAF/MEK/ERK desempeña en proliferación, diferenciación o migración celular, el correcto funcionamiento de esta vía es clave para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

La importancia de esta vía se hace patente por la existencia de alteraciones del desarrollo conocidas como síndromes RAS/MAPK o RASopatías, causadas por mutaciones en línea germinal de varios de sus componentes (Tidyman and Rauen, 2009; Hernández-Martín and Torrelo, 2011). Todos los pacientes comparten un grado variable de retraso mental o dificultades de aprendizaje, trastornos cardiacos, dimorfismo facial, macrocefalia, talla baja, anomalías cutáneas (pelo corto, rizado y escaso, lesiones hiperplásicas...) y, en algunos casos, predisposición al cáncer. En la Tabla I-2 se muestran algunos de estos síndromes y sus alteraciones moleculares.



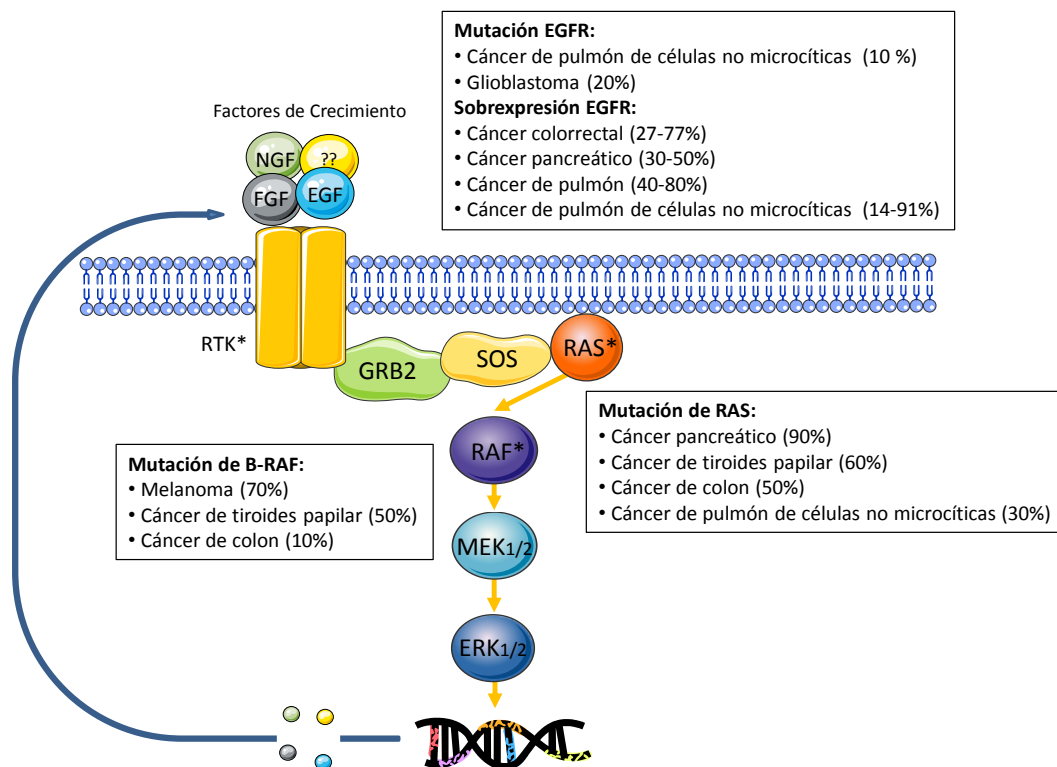
Síndrome	Cromosoma	Gen	Proteína	Función de la proteína
Noonan	12q24.1	PTPN11	SHP2	Fosfatasa
	2p22.1	SOS1	SOS1	RasGEF
	12p12.1	KRAS	KRAS	GTPasa
	3p25.1	RAF1	CRAF	Quinasa
	15q22.31	MAP2K1	MEK1	Quinasa
Cardio-facio-cutáneo	12p12.1	KRAS	KRAS	GTPasa
	7q34	BRAF	BRAF	Quinasa
	15q22.31	MAP2K1	MEK1	Quinasa
	19p13.3	MAP2K2	MEK2	Quinasa
Costello	11p15.5	HRAS	HRAS	GTPasa
	12p12.1	KRAS	KRAS	GTPasa
	7q34	BRAF	BRAF	Quinasa
	15q22.31	MAP2K1	MEK1	Quinasa
Neurofibromatosis1	17q11.2	NF1	Neurofibromina	RasGAP
Legius	15q14	SPRED1	SPRED1	Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1
Leopard	12q24.1	PTPN11	SHP2	Fosfatasa
	3p25.1	RAF1	CRAF	Quinasa
Malformación capilar-malformación arteriovenosa	5q14.3	RASA1	P120Gap	RasGAP
Linfoproliferativo autoinmune	1p15.2	NRAS	NRAS	GTPasa
Fibromatosis gingival 1	2p22.1	SOS1	SOS1	RasGEF

**TABLA I-2. CARACTERIZACIÓN BIOMOLECULAR DE LAS RASOPATÍAS.** Tabla en la que se indican diferentes RASopatías y los genes implicados en su etiología. Extraída de Hernández-Martín y Torreló, 2011.

Por otro lado, esta cascada de señalización es una de las más desreguladas durante la transformación celular y la progresión tumoral. Se han descrito una gran variedad de mutaciones somáticas oncogénicas en genes cuyos productos intervienen en la cascada de señalización (Normanno *et al.*, 2006; Dhillon *et al.*, 2007). En la Figura I-6 se muestran algunos ejemplos: las mutaciones activantes en *H-*, *K-* y *N-RAS* suponen el 30% de mutaciones de los tumores humanos (Adjei, 2001; Fernández-Medarde and Santos, 2011). B-RAF, por su importancia sobre la activación de ERK, es el gen *RAF* más frecuentemente mutado, especialmente en melanoma (Davies *et al.*, 2002; Wan, 2004; Emuss *et al.*, 2005). Todas estas alteraciones provocan la desregulación de la proliferación celular facilitando el desarrollo tumoral (Robert and Der, 2007; Lawrence *et al.*, 2008).

Por las consecuencias que supone la desregulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, su estudio tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas, sigue siendo objeto de análisis en multitud de laboratorios con el fin de comprender y diseñar estrategias que permitan revertir los efectos negativos asociados a su desregulación. Actualmente, se están

desarrollando gran cantidad de fármacos para tratar una amplia variedad de patologías como artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares o inflamatorias y diferentes tipos de cáncer. Entre los fármacos que ya se encuentran en uso como tratamiento antitumoral destacan el *Sorafenib*, como inhibidor de RAF y uno de los fármacos más eficaces contra el cáncer renal, hepático y de tiroides; *Cetuximab*, anticuerpo monoclonal empleado para tratar cáncer colorrectal y otros tipos de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello; también el *Gefitinib* y *Erlotinib*, ambos inhibidores de la actividad tirosina quinasa del EGFR, se usan en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (Robert and Der, 2007).



**FIGURA I-6. ACTIVACIÓN ONCOGÉNICA DE LA RUTA RAS/RAF/MEK/ERK.** Esquema mostrando algunos de los principales componentes de la vía que se han encontrado mutados en tumores humanos. Se indican, también, el porcentaje en el que estas mutaciones se encuentran presentes en diferentes tipos de cáncer. Imagen modificada de Robert and Der, 2007.

#### 4. REGULACIÓN DE LA RUTA RAS/RAF/MEK/ERK POR PROTEÍNAS ADAPTADORAS

El mantenimiento de la eficacia y especificidad de la transmisión de señales a través de las vías MAPKs, es asegurada por la acción de una gran variedad de proteínas de diferente naturaleza, que regulan la función de las proteínas centrales de estas rutas (Kolch, 2000; Morrison and David, 2003). Entre estas proteínas, encontramos las adaptadoras/andamio que se encargan de dar especificidad espacio-temporal a la cascada de señalización, unir moléculas de señalización en complejos multiproteicos o integrar las señales. Se han encontrado

proteínas de este tipo en todos los módulos MAPK, mostrando su importancia en el control de la magnitud y duración de las señales, lo que determinará también la respuesta celular (Pouyssegur *et al.*, 2002; Ebisuya *et al.*, 2005).

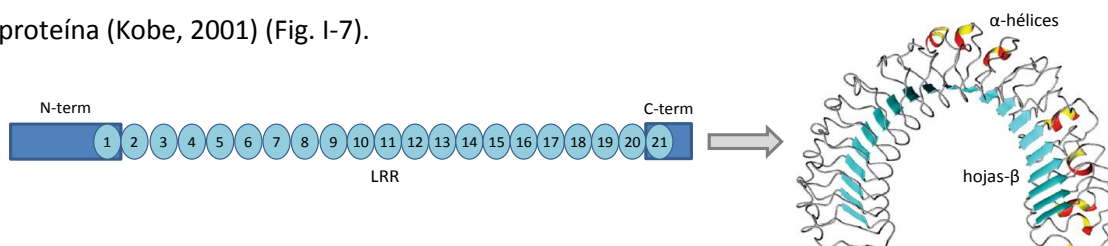
Durante los últimos años, se han acumulado muchos datos acerca de algunas de las proteínas adaptadoras/andamio que participan en la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK: por ejemplo, MP1 regula la señalización en endosomas uniendo tanto MEK1/2 como ERK1/2 (Teis *et al.*, 2002); KSR (*Kinase Suppressor of Ras*), tras la activación de RAS, interacciona constitutivamente con MEK y lo dirige a la membrana plasmática, donde coordina el ensamblaje del complejo RAF/MEK/ERK favoreciendo la transmisión de la señal (Nguyen *et al.*, 2002; Ritt *et al.*, 2005); CNK se une a C-RAF y Src formando un complejo trimérico que estimula la actividad de RAF (Ziogas *et al.*, 2005). En este proyecto de Tesis doctoral, se ha procedido al estudio de la proteína Sur8, que pese a carecer de actividades enzimáticas, modula la ruta RAS/RAF/MEK/ERK a través de su función adaptadora y que puede tener un papel relevante en diferentes patologías en las que está implicada esta vía de señalización.

#### 4.1 SUR8: REGULADOR POSITIVO DE LA VÍA RAS/RAF/MEK/ERK

Sur8/Shoc2 (*Suppressor of Ras mutation 8*), es una proteína adaptadora de unión a RAS que se describió simultáneamente por dos grupos empleando *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo (Sieburth *et al.*, 1998; Selfors *et al.*, 1998). Conservada en todos los organismos multicelulares y ampliamente expresada, esta proteína actúa como regulador positivo de la vía RAS/RAF/MEK/ERK inducida por factores de crecimiento.

##### 4.1.1 Estructura, distribución subcelular y mecanismo de acción

En su estructura proteica de 582 aminoácidos (63 kDa), Sur8 presenta un dominio N-terminal rico en lisinas, seguido de 21 dominios ricos en leucina dispuestos en tándem (*leucine-rich repeats*, LRR). Las LRR están compuestas por 20-30 aminoácidos con una secuencia consenso (LxxLxLxxNxL; x: cualquier aminoácido) que dan lugar a una estructura terciaria en herradura formada por hélices- $\alpha$  y láminas- $\beta$ , que permite la interacción proteína-proteína (Kobe, 2001) (Fig. I-7).

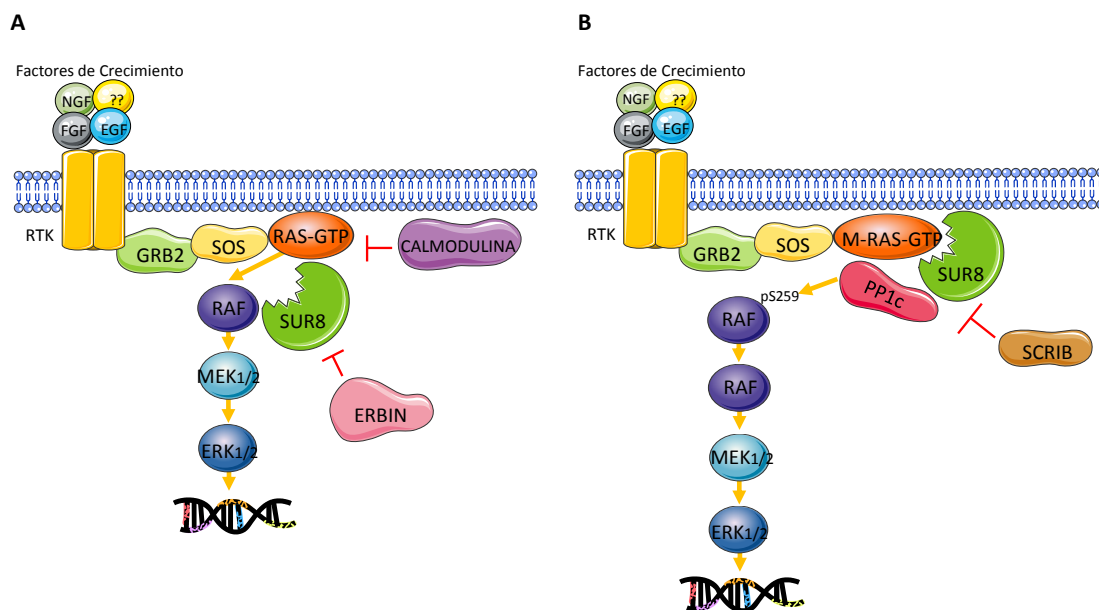


**FIGURA I-7. ESTRUCTURA DE SUR8.** A la izquierda, representación esquemática de los distintos dominios LRR característicos de Sur8. El LRR1 está contenido en la secuencia amino terminal, mientras que el LRR21 se encuentra en el extremo carboxilo. A la derecha, se muestra la conformación proteica en herradura. Adaptado de Jeoung *et al.*, 2013.

La distribución subcelular de Sur8 es variable, encontrándose en citoplasma y asociado a endosomas tardíos, donde podría ejercer su función potenciadora de la vía RAS/RAF/MEK/ERK. Sin embargo, en varias ocasiones se ha señalado su presencia en el núcleo celular (Cordeddu *et al.*, 2009; Jeoung *et al.*, 2013), aunque su función en este orgánulo es aún desconocida. La región C-terminal de Sur8 se considera responsable de la localización en endosomas tardíos y la N-terminal es esencial para la presencia de Sur8 en núcleo (Jeoung *et al.*, 2013).

Para explicar su función reguladora sobre la vía RAS/RAF/MEK/ERK, existen dos modelos:

- En el primer modelo, Sur8 estaría facilitando la interacción RAS/RAF. Inicialmente, se describió la interacción de Sur8 con K- y N-RAS-GTP, y con menor afinidad por H-RAS-GTP, facilitando a su vez la interacción de estas proteínas con RAF (Li *et al.*, 2000; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010). Este modelo ha ido enriqueciéndose, incluyendo a la proteína ERBIN como posible regulador negativo de la vía de ERK al romper la triple interacción RAS/Sur8/RAF por unión a Sur8 (Dai *et al.*, 2006). También, se ha considerado que además de la forma activa de K- y H-RAS, es necesario el aumento de calcio citoplasmático para que esta triple interacción se lleve a cabo, debido a que el calcio desplaza la calmodulina que se encuentra bloqueando estas isoformas en estado basal (Yoshiki *et al.*, 2010) (Fig. I-8A).
- En el segundo modelo propuesto, se ha descrito que la actuación de Sur8 implica a la subunidad catalítica de PP1 y a M-RAS (sobreeexpresada en corazón y cerebro, Fig. I-3). Este complejo es capaz de desfosforilar la serina inhibitoria de RAF en posición 259, consiguiendo así su activación (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006). Recientemente, se ha sugerido que M-RAS interacciona con Sur8 por su extremo N-terminal y que la unión de Sur8 con RAF es a través de M-RAS, no por unión directa (Fig. I-8B) (Jeoung *et al.*, 2013). A este modelo también se ha incorporado la proteína SCRIB como regulador negativo de la vía de ERK al competir por su unión a PP1 e impedir la triple interacción M-RAS/Sur8/PP1 (Young *et al.*, 2013).



**FIGURA I-8. MECANISMO DE ACCIÓN DE SUR8.** Representación esquemática de los dos modelos que explican el mecanismo mediante el cual Sur8 podría potenciar la vía de activación de ERK: (A) Modelo clásico propuesto por Li y colaboradores junto otras aportaciones (Li *et al.*, 2000; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010; Yoshiki *et al.*, 2010), en el que Sur8 estaría formando el triple complejo RAS/Sur8/RAF; (B) Modelo expuesto por Rodríguez-Viciano con las últimas contribuciones (Rodríguez-Viciano *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2013), en el que se muestra la interacción de Sur8 con M-RAS y PP1c.

En diferentes publicaciones se ha analizado si Sur8 podría estar implicado en otras vías de señalización diferentes de ERK, como JNK o AKT/PKB, pero el resultado siempre ha sido negativo, considerando que la función de Sur8 es exclusiva de la vía de ERK (Li *et al.*, 2000; Rodríguez-Viciano *et al.*, 2006).

#### 4.1.2 Función *in vivo* e implicación en patologías

Pese a que actualmente se disponen de bastantes datos sobre la función adaptadora de Sur8 en la cascada RAS/RAF/MEK/ERK, las consecuencias fisiológicas que se derivan de su ausencia, sobreexpresión o mutación siguen siendo aspectos muy poco estudiados hasta la fecha. Un trabajo de nuestro grupo, muestra como Sur8 es esencial para modular una apropiada activación de ERK inducida por NGF o EGF y la diferenciación de células PC12 (León *et al.*, 2014). En estas células, el EGF induce una activación de ERK rápida y transitoria que provoca la proliferación de las células y, por el contrario, NGF induce una fosforilación de ERK más lenta y sostenida que permite el desarrollo de las neuritas en PC12. En este modelo, Sur8 promueve la diferenciación en presencia de EGF, ya que su sobreexpresión produce una activación de ERK más persistente que origina la diferenciación de las células (León *et al.*, 2014). En relación con estos resultados y sobre el papel de Sur8 *in vivo*, se ha descrito como la expresión de Sur8 se va reprimiendo a lo largo de la diferenciación de progenitores neurales en el córtex cerebral de embriones de rata. Del mismo modo, la eliminación de Sur8 *ex vivo*

reduce el número y tamaño de las neuroesferas aumentando su diferenciación. Sur8, por tanto, parece ser un potencial marcador de células madre neurales que previene la diferenciación y estimula la capacidad de autorenovación de progenitores neurales, efectos dependientes de la vía de ERK (Moon *et al.*, 2011).

En cuanto a su estudio con modelos animales, se ha descrito que la disrupción génica de *Sur8* en línea germinal murina, resulta en letalidad embrionaria temprana y absorción parcial de los embriones mutantes en estadio 8.5, mientras que la delección específica de *Sur8* en células endoteliales da lugar a mortalidad embrionaria tardía, debido a problemas en el desarrollo del corazón por una vía independiente de ERK (Yi *et al.*, 2010).

En relación a Sur8 y distintas patologías, se ha visto como su función parece jugar una función crítica en la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, ya que una mutación puntual en el codón que codifica la serina en posición 2 está relacionada con una de las RASopatías presentadas anteriormente, un tipo de síndrome de *Noonan* con cabello anágeno suelto (Cordeddu *et al.*, 2009; Gripp *et al.*, 2013; Takenouchi *et al.*, 2014). Esta mutación genera un sitio aberrante de miristoilación que ancla a Sur8 en membrana, impidiendo su correcta función reguladora. Sin embargo, hay controversia respecto a si este cambio de localización aumenta la activación de ERK o no (Cordeddu *et al.*, 2009; Galperin *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito una nueva mutación en Sur8 (c.519G>A; p.M173I) ligada a estos desórdenes, en el que se ha visto como la proteína mutante posee una reducida capacidad para interactuar con PP1c, dando lugar a una disminución en la actividad de ERK1/2 (Hannig *et al.*, 2014). Sobre su implicación en tumorigénesis, se ha encontrado una disminución en la expresión de Sur8 en muestras de pacientes de cáncer colorrectal (Piepoli *et al.*, 2012). Además, estudios con líneas tumorales muestran como Sur8 es necesario para mantener las propiedades malignas de células con RAS mutado como son la inhibición por contacto, la proliferación independiente de anclaje a sustrato, la formación de tumores en ratones y la migración celular (Young *et al.*, 2013).

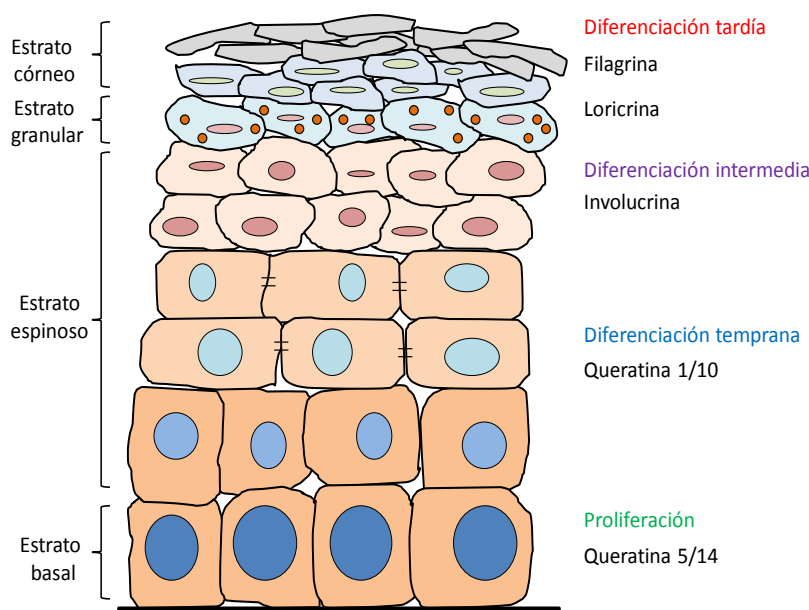
## 5. LA EPIDERMIS MURINA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA VÍA RAS/RAF/MEK/ERK

Estudios genéticos en ratones han puesto de manifiesto la necesidad de la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK activada por RTKs para el correcto desarrollo y mantenimiento de la fisiología de la piel, desempeñando además un importante papel durante la tumorigénesis epidérmica. Por ello, la mayor parte del trabajo realizado durante esta tesis doctoral sobre el papel de Sur8 *in vivo* se ha elaborado empleando la epidermis como modelo.

### 5.1 ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS

En la superficie de nuestro cuerpo, la epidermis y sus apéndices nos proporcionan la primera barrera protectora del organismo contra agresiones externas. Subyacente a la epidermis, se encuentra la dermis, una matriz de tejido conjuntivo donde se localizan los fibroblastos, junto con vasos sanguíneos, canales linfáticos y terminales nerviosos.

En la epidermis interfolicular, los queratinocitos se organizan formando un epitelio estratificado, caracterizado por una serie de capas con distintas capacidades proliferativas, grado de diferenciación y por la expresión de marcadores específicos (Fuchs and Green, 1980; Sotiropoulou and Blanpain, 2012) (Fig. I-11). En el estrato basal, se encuentran las células madre epidérmicas que confieren al tejido su alta capacidad de renovación (8-10 días en el caso del ratón) (Lavker and Sun, 1983; Potten and Morris, 1988; Koster and Roop, 2007; Koster, 2009; Blanpain and Fuchs, 2009). Estas células expresan de forma característica las queratinas 5 y 14 (K5, K14), y son capaces de dar lugar a progenitores no comprometidos y queratinocitos comprometidos suprabasalmente. El desplazamiento de estas células hacia la capa superior da lugar al estrato espinoso, con presencia de desmosomas entre los queratinocitos adyacentes (Franke *et al.*, 1987) y caracterizado por la expresión de marcadores de diferenciación temprana como queratina 1 y 10 (K1, K10) o involucrina. En el estrato granular, encontramos queratinocitos en diferenciación tardía que sintetizan loricrina o filagrina y que poseen característicos gránulos de queratohialina (Resing and Dale, 1991). La diferenciación terminal de los queratinocitos resulta en su muerte celular y liberación del contenido citoplasmático, dando lugar al estrato córneo (Fuchs, 1990; Candi *et al.*, 2005). Su renovación es constante gracias al aporte continuado de células, mientras que las células muertas son eliminadas por descamación (Potts and Francoeur, 1991).



**FIGURA I-11. ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS.** Esquema de la epidermis en el que se representan la capa basal proliferativa así como los diferentes estratos suprabasales (espinoso, granuloso y córneo). En cada uno de los estratos se especifican las proteínas marcadoras que se expresan en los mismos.

### 5.1.1. Morfogénesis de la epidermis murina

En ratón, la morfogénesis comienza alrededor del estadio 8.5 con una capa de células neuroectodérmicas no comprometidas. El compromiso epidérmico comienza alrededor del estadio 9.5 con la inducción de la expresión de K5 y K14. Durante el estadio 12.5 las células de la capa basal comienzan a dividirse asimétricamente y empieza el proceso de estratificación, apareciendo el estrato córneo en el estadio 18.5 (Fuchs, 2007; Simpson *et al.*, 2011). Durante los primeros días de vida, la epidermis sufre un proceso de adelgazamiento con pérdida de estratos, dando lugar a la epidermis madura alrededor del día 8-10 postnatal (Byrne *et al.*, 1994). Esta epidermis se caracteriza por poseer uno o dos estratos epidérmicos, además del estrato córneo, así como por un bajo nivel proliferativo de las células de la capa basal, suficiente para mantener la integridad del tejido.

## **5.2 UN ANEJO ESPECIALIZADO DE LA EPIDERMIS: EL FOLÍCULO PILOSO**

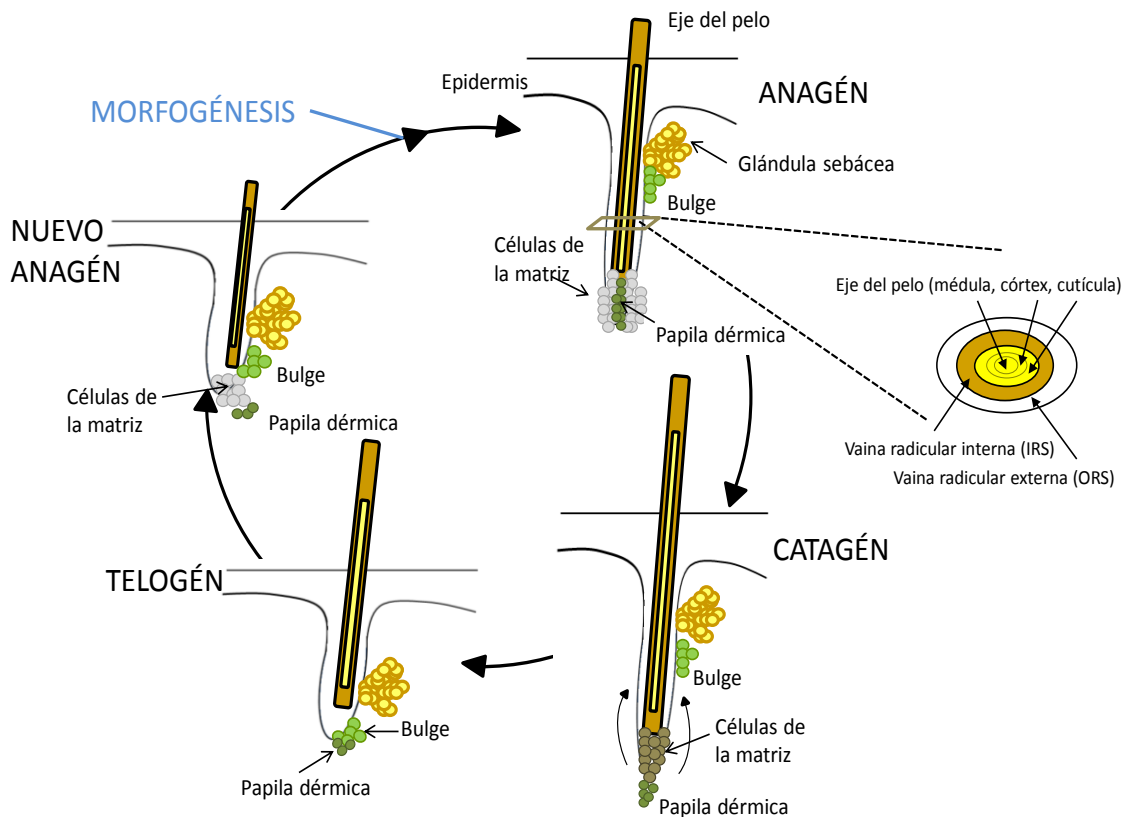
Los folículos pilosos se forman a través de complejas interacciones moleculares entre el epitelio y el mesénquima subyacente (Schneider *et al.*, 2009). Durante el desarrollo, determinadas células dérmicas, a través de mediadores solubles, producen una respuesta en el epitelio que induce una invaginación epidérmica, origen del futuro folículo. Dicha región epidérmica produce una segunda señalización hacia las células subyacentes para que organicen una papila dérmica, un conjunto de células especializadas de origen mesenquimal que se integrará en la propia estructura folicular regulando la formación, el desarrollo y los cambios cíclicos de degeneración/regeneración que sufre el folículo a lo largo de la vida (Fig. I-12). Alrededor de la papila dérmica se organizará una subpoblación de células epiteliales especializadas conocidas como células de la matriz. Ante una última señal producida por la papila dérmica, las células de la matriz comenzarán a diferenciar hacia varios subtipos celulares organizados concéntricamente que formarán la vaina radicular interna (IRS), vaina radicular externa (ORS) y un canal central donde aparecerá una estructura queratinizada, origen del pelo (Hardy, 1992).

Después de las primeras dos semanas de vida postnatal en el ratón, cuando la morfogénesis del folículo ya está completada, las primeras células de la matriz degeneran y el folículo entra en una fase destructiva por apoptosis, conocida como catagén, que produce una regresión del folículo hacia la zona subepidérmica. La porción que permanece entra en fase de reposo, denominada telogén. El primer telogén es corto, desde el día postnatal 19 al 21. El segundo telogén, sin embargo, dura más de 2 semanas y empieza sobre el día 42, haciéndose más largos con la edad. El nuevo crecimiento del pelo (fase de anagén) comienza por acción de



señales enviadas por la papila dérmica que estimulan la activación de las células troncales del folículo, situadas en el *bulge* (Millar, 2002; Lee and Tumber, 2012).

El *bulge*, es una protuberancia lateral del folículo donde se localizan estas células troncales, caracterizadas por expresión de K15, CD34 y Lgr5. Las células del interior del *bulge*, positivas para K6, se mantienen quiescentes enriquecidas en inhibidores y represores del ciclo celular durante la fase telógena. En respuesta a las señales de la papila dérmica estas células migran a lo largo de la ORS hasta la matriz, donde darán lugar al nuevo pelo en la capa grasa subdérmica.



**FIGURA I-12. ETAPAS DEL CICLO FOLICULAR.** Representación esquemática de la evolución morfológica que sufre un folículo piloso durante las diferentes etapas del ciclo: Anagén o fase de crecimiento del folículo, Catagén o fase de destrucción del folículo y Telogén o fase de quiescencia del folículo. A la derecha, se observa el esquema de la estructura de un folículo piloso en sección transversal.

### 5.3 LA VÍA RAS/RAF/MEK/ERK EN EPIDERMIS

La señalización a través del EGFR desempeña un papel crítico en la fisiología epidérmica y el crecimiento del pelo. En la piel adulta, el EGFR está expresado principalmente en los queratinocitos basales con capacidad proliferativa, en menor cantidad en los queratinocitos suprabasales y también en la ORS del pelo (Sakai *et al.*, 1994). La disminución de la señalización por EGFR da lugar a atrofia epidérmica, un descenso en la proliferación de las células troncales epidérmicas interfoliculares, alopecia progresiva y diferenciación prematura del folículo piloso (Miettinen *et al.*, 1995; Sibia and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995;

Janes and Watt, 2006). La delección de H-, K- y N-RAS en la epidermis murina, resulta en una epidermis substancialmente más fina durante el desarrollo embrionario, por cese de la proliferación de los queratinocitos y con aparición tardía de marcadores de diferenciación (Drosten *et al.*, 2014). Por otro lado, los ratones doble KO para B-RAF y C-RAF en epidermis muestran pelo rizado y disperso, seguido de su pérdida progresiva, indicando que tienen funciones solapantes regulando el ciclo del pelo (Galabova-Kovacs *et al.*, 2008). La eliminación de ambos alelos de MEK1/2 y ERK1/2 en la epidermis murina, da lugar a una disminución en la proliferación e hipoplasia, así como reducción en el número de folículos pilosos (Scholl *et al.*, 2004; Scholl *et al.*, 2007, Dumesic *et al.*, 2009).

De forma complementaria, la activación constitutiva del EGFR, RAS o componentes de la vía RAF/MEK/ERK en epidermis, da lugar a hiperproliferación e hiperplasia epidérmica y una disminución en la expresión de marcadores de diferenciación, eventualmente desarrollando cáncer piel (Dajee *et al.*, 2002; Tarutani *et al.*, 2003, Scholl *et al.*, 2004; Khavari and Rinn, 2007; Scholl *et al.*, 2009; Ehrenreiter *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2013).

Estos resultados indican que la señalización EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK es absolutamente requerida para un adecuado desarrollo y mantenimiento de la homeostasis epidérmica, así como para la correcta progresión del ciclo del pelo. Por esta razón, la epidermis supone un contexto ideal para el estudio de Sur8 *in vivo*.





# OBJETIVOS



Actualmente, numerosos estudios relacionan a proteínas adaptadoras con procesos de proliferación, diferenciación celular y patologías como el cáncer. Nuestra hipótesis es que Sur8, por su papel como proteína andamio de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, es clave en estos procesos. Por ello, en este proyecto de Tesis Doctoral se plantean tres objetivos generales con el fin de comprobar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la importancia de la proteína Sur8 en la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK:

- 1. Estudiar el papel de Sur8 en procesos celulares como la adhesión, proliferación o migración celular.**
- 2. Analizar la importancia de la localización subcelular de Sur8 para ejercer su función adaptadora.**
- 3. Investigar los efectos fisiológicos derivados de la supresión *in vivo* de Sur8:**
  - a. Generar un modelo de ratón KO condicional de Sur8.
  - b. Estudiar la importancia de Sur8 en el desarrollo y en la homeostasis de la epidermis murina.
  - c. Analizar los efectos de la supresión de Sur8 en el animal adulto.





# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. PLÁSMIDOS

Como vectores de expresión en eucariotas se emplearon: pCEFL, pMCEF, pCDNAIII y pEF1. Todos ellos controlados por el promotor de citomegalovirus, salvo en el caso del pCEFL que está dirigido por el promotor del factor de elongación 1 $\alpha$ . La mayoría de los plásmidos poseen un epítipo (myc, HA o AU5) para su posterior reconocimiento por anticuerpos.

Plásmido	Procedencia
pCEFL-KZ-AU5	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-HA	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-AU5-K RAS4B V12	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pMCEF-B RAF V600E	Laboratorio del Dr. Antonio Chiloehes
pCDNAIII-MEK1 EE	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-HA-ERK1	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sur8 $\Delta$ NLS	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-MYR-Sur8	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-LCK-Sur8	Laboratorio del Dr. J.M. Rojas
pCDNAIII-Gal4-Elk1	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pGal4-Luc	Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind
pRL-TK	Promega

wt: *Wild-type*

### 1.1 GENERACIÓN DE MUTANTES

A partir del plásmido pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt fueron generados, por mutagénesis dirigida usando oligonucleótidos específicos, las construcciones pEF1-Sur8 S2G-myc y pCEFL-KZ-Sur8 S2G:

	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')
<b>pEF1-Sur8 S2G-myc</b>	Sur8 S2G_BAMHI	AAAGGATCCATGAGTAGTAGTTTAGGAAAG
	Sur8 non TGA_NOTI	AAAGCGGCCGCGACCATGGCACGATA
<b>pCEFL-KZ-Sur8 S2G</b>	Sur8 S2G_BAMHI	AAAGGATCCATGAGTAGTAGTTTAGGAAAG
	Sur8_NOTI	AAAGCGGCCGCTCAGACCATGGCACGATA

El producto resultante fue comprobado por secuenciación con los siguientes oligonucleótidos:

	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')
pEF1	pEF1_3	ATGCGATGGAGTTTCC
	pEF1_5	TCCTGTCACCCTCACC
pCEFL	pCEFL1_3	AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT
	pCEFL1_5	AAGGAACTGGGACCTTCCACGGTGAGGGTG

## 2. CEPAS BACTERIANAS

Para el mantenimiento de los diferentes DNAs se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen). La purificación del DNA plasmídico se realizó con el kit Jetstar 2.0 (Genomed).

### 2.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hanahan y colaboradores (Hanahan, 1983).

## 3. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS

### 3.1 LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humificada al 5% de CO<sub>2</sub>:

- Línea celular HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*): Línea establecida a partir de células de tejido epitelial de riñón embrionario humano con el antígeno T del SV40 (ATCC: CRL-11268).
- Línea celular HeLa: Línea de células humanas procedentes del adenocarcinoma de cérvix epitelial de Henrietta Lacks (ATCC: CCL-2).
- Línea celular HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*): células endoteliales de vena umbilical humana. Consideradas como una línea celular establecida pero con un límite de pases alrededor del número 14 (ATCC: CRL-1730).
- Línea celular NIH3T3: Línea celular originada a partir de fibroblastos obtenidos de embrión de la cepa de ratón NIH/Swiss (ATCC: CRL-1658).
- Línea celular COS7: Línea establecida a partir de células de riñón de mono verde (*Cercopithecus gethiops*) transformadas con el antígeno T del SV40 (ATCC: CRL-1651).

- Línea celular RT112 (control y FGFR1): línea celular humana derivada de un carcinoma de vejiga urinaria (RT112-control) con el receptor FGFR1 sobreexpresado (RT112-FGFR1). Ambas cedidas por el Dr. Francisco Real (CNIO).

Todos los tipos celulares fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FS) (Hyclone), 4 mM de Glutamina (Lonza) y 200 U/ml de Penicilina/Estreptomicina (Lonza). Excepto las células NIH3T3, que se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% suero de ternero bovino (CS) (Gibco), con los mismos suplementos y antibióticos.

En los casos en los que las células fueron estimuladas con factores de crecimiento como FGF, EGF, VEGF, S1P o SDF-1 (Sigma-Aldrich), 16h antes, se privaron de suero y se mantuvieron en DMEM suplementado con 10 mM de HEPES pH 7.5 (Gibco), 4 mM Glutamina y 200 U/ml Penicilina/Estreptomicina.

### **3.2 CULTIVO PRIMARIO DE QUERATINOCITOS DE RATÓN**

Los queratinocitos primarios se obtuvieron a partir de la epidermis de ratones de entre 3 y 5 meses de edad. Una vez sacrificados, se les amputó la cola y se hizo una incisión longitudinal con un bisturí en la base. Con la ayuda de unas pinzas estériles se separó la piel del hueso de la cola. Cada una de las pieles obtenidas se colocó con la dermis hacia abajo en una placa Petri con tripsina al 0,75% (Gibco), durante 1h a 37°C. Tras este tiempo de incubación y con la ayuda de las pinzas, se separó la epidermis de la dermis. La epidermis fue transferida a un tubo de 50 ml (Falcon) conteniendo 12 ml de medio de cultivo “Minimun Essential Media” (MEM, Sigma-Aldrich) suplementado con FS al 8% tratado con resina “Chelex-100” (BioRad), Penicilina/Estreptomicina/Glutamina 1X (Gibco) y DNasa a 250 µg/ml (Sigma-Aldrich). El tratamiento del FS con la resina siguiendo las instrucciones del fabricante, elimina el calcio libre existente en el suero, pudiendo controlar así la concentración final de este catión crítico para los queratinocitos. El tubo se mantuvo en un baño a 37°C en agitación durante 30 min. La suspensión resultante fue filtrada a través de una malla estéril de teflón (70 µm, Falcon), eliminándose así los agregados de células cornificadas. El filtrado se centrifugó durante 2 min a 1.200 r.p.m y el pellet con los queratinocitos fue resuspendido en medio MEM con FS quelado al 8%, CaCl<sub>2</sub> al 0,05 mM y Penicilina/Estreptomicina/Glutamina 1X. La baja concentración de calcio impide la proliferación de posibles fibroblastos contaminantes. Seguidamente, los queratinocitos aislados fueron sembrados en placas P60 (Falcon) cubiertas de colágeno humano tipo I recombinante (“Coating Matrix kit”, Cascade biologics). Al día siguiente, el medio fue reemplazado por “Keratinocyte-Serum Free Media” (KSF) suplementado con

glutamina, EGF y extracto pituitario bovino (Gibco). Los queratinocitos primarios fueron mantenidos a 32°C en una atmósfera humificada al 5% de CO<sub>2</sub>.

En el caso en el que los queratinocitos fueron estimulados con EGF (Sigma-Aldrich), tras 24h desde el aislamiento, se sometieron a 16h de medio de ayuno consistente en KSF sin suplementos. Pasado este tiempo, fueron estimulados con EGF a 100 ng/ml y tras 5 min de estimulación, fueron procesados inmediatamente para el posterior análisis de proteínas por Western-Blot (WB).

#### 4. ENSAYOS BIOQUÍMICOS *IN VITRO*

##### 4.1 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Las células HEK 293T, HeLa o Cos7, se sembraron el día anterior a la transfección a un confluencia de aproximadamente el 70%. La transfección transitoria de 1-4 µg de los diferentes plásmidos se realizó empleando el reactivo “Jet-Pei” (Polyplus-Transfection), siguiendo el manual del usuario.

##### 4.2 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Para los ensayos de inmunoprecipitación (IP), el lisado de las células se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 10.1. Una vez obtenidos los extractos celulares, se tomó el 10% del volumen del sobrenadante como extracto total y el resto de volumen se incubó con 1 µg/ml del anticuerpo α-HA durante 2h a 4°C en rotación. Pasado ese tiempo se añadieron 30 µl de “gamma-bind sepharose beads” (GE Healthcare) y se incubó durante 1h en rotación a 4°C. Seguidamente, se procedió a su centrifugación (5 min a 9.000 r.p.m) y a los lavados de los complejos formados con la resina con el mismo tampón de lisis empleado (sin inhibidores). Tras 3 lavados, los complejos aislados en el precipitado se resolvieron mediante SDS-PAGE y se visualizaron por WB convencional (apartado 10.1).

##### 4.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RNA DE INTERFERENCIA

El RNA de interferencia (siRNA) de Sur8 se obtuvo de Thermo Scientific. Los oligonucleótidos sintetizados corresponden a la región codificante del gen *SUR8* humano: #1:GACCUUAGCUAGAAAUUGC, #2:GAAAUUGGUACACUGGAGA, #3:GAAACCUUAGGAAGUUAA, #4:UCGUUAUACUACUGUGGAA. El cóctel de siRNA Sur8, o el siRNA control, fueron transfectados a una concentración de 50 nM utilizando “Lipofectamina RNAiMAX reagent” (Invitrogen), simultáneamente a la siembra de las células HEK 293T, HeLa o HUVECs. Al día

siguiente se les puso medio de cultivo nuevo. Las células transfectadas se emplearon para los experimentos durante 48-72h post-transfección.

#### 4.4 INFECCIÓN CON ADENOVIRUS DE QUERATINOCITOS PRIMARIOS

Los queratinocitos primarios, aislados de la cola de los ratones KO condicionales *Sur8<sup>flox/flox</sup>* y cultivados en placas P60 (Falcon), fueron infectados con adenovirus (ViraQuest Inc.) que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) (Adeno-GFP) para utilizarse como control, o la recombinasa Cre (Adeno-Cre) para conseguir la delección del exón de *Sur8* flanqueado por los sitios LoxP y la consecuente eliminación de su expresión. Para ello, al día siguiente de su aislamiento, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células fueron incubadas durante toda la noche con 2 ml de medio que contenían los adenovirus purificados en un ratio de 20 partículas infecciosas por célula ( $6 \times 10^7$  PFU/placa). Al día siguiente, se sustituyó el medio con los adenovirus por medio normal y se esperó 72h para el análisis de los queratinocitos (para asegurar la degradación de la proteína remanente).

#### 4.5 ENSAYO DE ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

Para medir el grado de activación del factor de transcripción Elk1 se realizaron ensayos de actividad Luciferasa. Para ello, se cotransfectaron transitoriamente células Cos7 con: 1) 0,67 µg de pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pCEFL-KZ-AU5-MYR-Sur8 o pCEFL-KZ-Sur8 S2G; 2) 16,6 ng del pCDNAIII-Gal4-Elk1, plásmido que expresa el factor de transcripción quimérico Gal4-Elk1; 3) 0,1 µg del plásmido pRL-TK que contiene el gen de la luciferasa Renilla (aislado de *Renilla reniformis*) bajo el control del promotor HSV-TK; 4) 0,35 µg del plásmido TATA-Gal4-Luc que contiene el gen reportero que codifica la enzima luciferasa Photinus (aislada de la luciérnaga *Photinus pyralis*) bajo el control de 6 copias del elemento de respuesta de Gal4.

24h después de la transfección, las células se mantuvieron 16h en medio de ayuno antes de ser estimuladas. 6h post-estimulación, las células se lavaron en PBS 1X y se lisaron con “passive lysis buffer” siguiendo el manual de instrucciones del “Dual-Luciferase Kit Reporter Assay” (Promega). La emisión de luz se cuantificó en un luminómetro *Monolight 2010*. La actividad Renilla, se utilizó para normalizar la actividad luciferasa Photinus como medida de la eficiencia de transfección. En todos los experimentos, los puntos de estudio se realizaron por triplicado.

#### 4.6 SEPARACIÓN MEMBRANA/CITOPLASMA

Las células transfectadas se resuspendieron en tampón B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA) con inhibidores de proteasas (10 µg/ml de Aprotinina/Leupeptina) y β-

mercaptoetanol a 10 mM. Los lisados se homogeneizaron pasándolos 30 veces por una jeringa con aguja de insulina (25G). Tras centrifugar a 1.200 r.p.m durante 5 min a 4°C para eliminar los núcleos celulares, se recogió el sobrenadante y se sometió a otra centrifugación de 9.000 r.p.m durante 20 min. El sobrenadante resultante corresponde a la fracción citosólica. El pellet restante se lavó en tampón TNET con Tritón X-100 al 1% y se incubó en hielo durante 30 min. Mediante una última centrifugación (9.000 r.p.m durante 20 min), se recogió el sobrenadante correspondiente a la fracción de membrana. El análisis por WB se llevó a cabo de la forma convencional (apartado 10.1).

### **4.7 SEPARACIÓN NÚCLEO/CITOPLASMA**

La separación de estas fracciones celulares se realizó empleando el “Nuclear/Cytosol Fractionation kit” (BioVision). El protocolo fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.8 FRACCIONAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA EN GRADIENTES DE SACAROSA**

Las células previamente transfectadas, tratadas y mantenidas con una confluencia máxima del 60-80%, se lisaron en 500 µl de tampón TNET (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) con 0,25% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas (10 µg/ml de Aprotinina/Leupeptina y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Para conseguir la disgregación de las membranas, las muestras se pasaron 20 veces por una jeringa con aguja 25G. Tras unos 30 min de tiempo de lisado, se separó el 10% del volumen total para obtener el lisado total de la muestra. Al resto de volumen, se le añadieron 500 µl de sacarosa al 90% (diluida en tampón TNET sin Tritón) y este homogeneizado fue transferido a un tubo de ultracentrífuga. En la parte superior del tubo, se añadieron poco a poco 3,4 ml de sacarosa al 35% y luego 1 ml de sacarosa al 16%. Los tubos se centrifugaron 16h a 40.000 r.p.m en un rotor SW55Ti (Beckman) a 4°C. Para analizar las proteínas asociadas a los diferentes microdominios de membrana por WB, se tomaron 12 fracciones de 400 µl desde la parte superior del tubo ya centrifugado.



## 5. ENSAYOS CELULARES *IN VITRO*

### 5.1 ENSAYO DE CRECIMIENTO DE POBLACIÓN

Se sembraron por triplicado el mismo número de células en placas de 6 pocillos (Falcon) con una confluencia del 30% aproximadamente. A lo largo de 3 días, se realizaron contajes tripsinizando las células y usando una cámara de Neubauer para los recuentos 24, 48 y 72h después de la siembra.

### 5.2 ENSAYO “CLICK-IT” PARA MEDIR PROLIFERACIÓN

Este ensayo se realizó con el kit comercial “Click-iT® EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit” (Molecular Probes). Las células se sembraron a un 50% de confluencia sobre cristales de 10/12 mm de diámetro y, el día posterior, se realizó el tratamiento correspondiente en medio de ayuno (16h). Seguidamente, las células se incubaron con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), análogo de la timidina, durante 6h. Pasado este tiempo, se fijaron las células con formaldehído al 3,7% durante 15 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% (Sigma-Aldrich) durante 20 min. La tinción del EdU, junto con los núcleos celulares con Hoechst, se visualizó empleando el microscopio de fluorescencia.

### 5.3 ENSAYO DE ADHESIÓN

Al comienzo del ensayo se trataron las placas multipocillo P6 (Falcon) con colágeno tipo I como sustrato (Sigma). Para el ensayo, se levantaron las células con 1,5 mM EDTA-PBS, para no dañar las integrinas, y se cuantificaron en cámara de Neubauer. El pellet correspondiente a  $1 \times 10^5$  células/pocillo, obtenido tras centrifugación (5 min a 1.200 r.p.m), se resuspendió en medio 1% BSA-PBS con o sin estímulos y, tras un tiempo de recuperación en el incubador, se cuantificó el número de células pegadas entre los 15 y 30 primeros minutos desde la siembra. Las células flotantes fueron aspiradas, de forma que solo se cuantificaron las células adheridas a la matriz mediante fotografías de campo claro empleando un microscopio invertido (*Nikon Eclipse TS100*).

### 5.4 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Para los ensayos de “migración por herida”, los cultivos celulares en alta confluencia (90%) fueron resuspendidos en un medio con 0,5% BSA-DMEM durante 2h previamente al ensayo para favorecer su migración. Los diferentes tratamientos también se realizaron en este medio. Para la realización de la “herida” se rasgó el cultivo empleando una punta de plástico

estéril. Tras absorber las células despegadas al realizar la herida, se fueron tomando fotografías en campo claro, siempre en el mismo punto, a las 0h, 3h, 6h y al día siguiente (O/N) con un microscopio invertido (*Nikon Eclipse TS100*) equipado con una cámara digital. El proceso de cierre fue cuantificado midiendo el área que queda libre en cada punto temporal y relativizando las mediciones al tamaño inicial de la misma.

## 6. MODELOS DE RATÓN

El trabajo realizado empleando ratones modificados genéticamente se llevó a cabo en los animalarios del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Ético para la experimentación animal de dicho centro. La cría y el mantenimiento de las distintas líneas KO condicionales y/o inducibles se realizaron en las instalaciones del animalario libre de patógenos específicos (SPF), mientras que los procedimientos realizados *in vivo* se efectuaron en el animalario convencional.

Los animales KO condicionales desarrollados para *Sur8* (*Sur8<sup>flox/flox</sup>*) poseen un fondo genético C57BL/6. Las líneas murinas transgénicas K5-CRE<sup>T/+</sup> y UBC-CRE<sup>ERT2 T/+</sup>, cedidas por el CNIO, poseen un fondo mixto enriquecido en C57BL/6, cepa en la que se mantienen las líneas resultantes del cruce entre ambas.

### 6.1 GENERACIÓN DEL MODELO GENÉTICO DE RATÓN KO CONDICIONAL PARA *SUR8*

La descripción detallada de la generación del modelo murino KO condicional de *Sur8* puede encontrarse en el apartado 3 de Resultados. De forma concisa, células madre embrionarias (ESCs) de la línea JM8A3.N1 (modificada genéticamente en el locus *Agouti* para restaurar el locus wt color agouti), con el vector de recombinación homóloga incorporado en el locus endógeno de *Sur8*, fueron adquiridas del KOMP (“Knockout Mouse Project repository”). El vector de tipo “KO-First-Reported Tagged Insertion” (*KO-First*) contiene una señal aceptora de *splicing* que rompe la pauta de lectura del gen, seguido de una caja de resistencia a neomicina (NEO) y, todo ello, flanqueado por sitios FRT. El exón 2 de *Sur8* queda flanqueado por secuencias LoxP.

En la Unidad de transgénesis del CNIO, el clon de ESCs Shoc2-E05, verificado mediante PCR, se introdujo en blastocistos de fondo genético C57BL/6N en estadio 3.5 (5-6 células inyectadas por embrión). Los blastocistos se transfirieron al oviducto de hembras en estadio 0.5 de pseudogestación. Se transfirieron unos 15 embriones por hembra, unilateralmente, y se dejaron desarrollar a término para dar lugar a los animales quiméricos. Aquellas quimeras

capaces de transmitir el alelo recombinante se utilizaron como fundadores de la colonia KO condicional ( $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$ ), tras un cruce previo con una cepa transgénica portadora de la recombinasa *Flipase* (FLP) (apartado 3 de Resultados).

Los animales KOs en piel para Sur8 fueron generados al cruzar los animales  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$  con ratones transgénicos K5-Cre<sup>T/+</sup> (Tarutani *et al.*, 1997). La línea UBC-CRE<sup>ERT2 T/+</sup>, que expresa ubicuamente la recombinasa Cre tras activación con tamoxifeno (Schwenk *et al.*, 1998), fue empleada para la obtención de ratones adultos KOs para Sur8.

## 7. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y PCR DE GENOTIPADO

Para el genotipado de los animales se extrajo DNA genómico a partir de un fragmento de 0.5-1 cm de cola de ratones de 18-23 días de edad. El protocolo realizado está basado en el método universal de extracción de DNA con sal e isopropanol (Aljanabi and Martinez, 1997). Las colas se incubaron con 300 µl de tampón de homogeneización estéril (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,45% de NP40 y Tween20) con proteinasa K (0,5 mg/ml) y se tuvieron a 55°C en agitación O/N. Al día siguiente, se procedió a la purificación del DNA mediante la adición de Fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico en proporción 25:24:1 (Sigma-Aldrich). Tras su centrifugación a 14.000 r.p.m durante 5 min, se añadió un volumen de cloroformo (Sigma-Aldrich) a la fase superior, y se realizó una nueva centrifugación. La fase acuosa superior que contiene el DNA se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 7) y 2.5 veces el volumen de isopropanol. El DNA precipitado, tras centrifugación a 14.000 r.p.m 10 min, se lavó 3 veces con etanol al 70% para eliminar sales residuales y, tras ser secado, se resuspendió en agua libre de DNAsas.

La presencia de los diferentes alelos de Sur8 se detectó mediante PCR a partir de aproximadamente 200 ng de DNA, usando el reactivo “TaKaRa Ex Taq™” (Takara). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR están indicadas en la Tabla MM-1. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

### **Alelos Sur8:**

- 1 min a 94°C
- (1 min a 94°C, 45 seg a 58°C, 2 min a 72°C) x 40 repeticiones
- 10 min a 72°C

### **Alelos Cre:**

- 1 min a 94°C
- (1 min a 94°C, 45 seg a 58°C, 2 min a 72°C) x 35 repeticiones
- 10 min a 72°C

TABLA MM-1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL GENOTIPADO DE RATONES.

Alelo	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'→3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'→3')	Tamaño amplicón
Sur8 wt	TTATTGATAGTTTATTAAATATGAGTAGGT	AAGTACTTTTAAAAATGGGGGAGG ( <i>FloxR</i> )	535 pb
Sur8 flox	( <i>FloxF</i> )		579 pb
Sur8 wt	GAGCTCTCCTTATAACGTAGCTTCT		2100 pb
Sur8 flox	( <i>mShoc2F</i> )		2164 pb
Sur8 nulo			606 pb
K5-Cre	CGGTCGATGCAACGAGTGATGAGG	CCAGAGACGGAAATCCATCGCTCG	660 pb
UBC-CRE <sup>ERT2</sup>	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	100 pb

Por último, los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa/TAE 1X (89 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8) al 2%. 10 µl del producto de PCR mezclado con tampón de carga (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol y verde xilencianol), se cargaron en cada calle del gel y se corrieron a 80 V durante al menos 1h. Los fragmentos de DNA se visualizaron con bromuro de etidio (1 mg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta, determinando así la existencia de los correspondientes fragmentos. En todos los casos se usaron como marcadores de peso molecular “Hyperladder IV” (100 pb) o “Hyperladder V” (1Kb) (Bioline), según el tamaño de las bandas a visualizar.

## 8. PROCEDIMIENTOS *IN VIVO*

### 8.1 ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFENO

Para el modelo inducible Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-CRE<sup>ERT2</sup> T/+ fue necesaria la administración de tamoxifeno para activar la función de la recombinasa Cre en estos animales. Empleamos dos vías de administración: pellets de comida con tamoxifeno (Harlan), suministrados durante toda la duración del experimento, o inyección intraperitoneal (2 mg por ratón durante 5 días consecutivos). La preparación del tamoxifeno para la administración intraperitoneal consistió en la disolución del tamoxifeno (Sigma-Aldrich) en etanol 100% y aceite de maíz (Sigma-Aldrich). El volumen de etanol corresponderá al 10% del volumen final y el resto de volumen, hasta alcanzar una concentración de 20 mg/ml, corresponde al aceite de maíz. Se recurrió a la sonicación para conseguir la completa disolución de la mezcla. El tubo se mantuvo en hielo y en oscuridad para evitar la degradación del tamoxifeno hasta el momento de su uso.

## 8.2 ADMINISTRACIÓN DE EdU PARA MEDIR PROLIFERACIÓN

Para realizar este ensayo se inyectaron a los ratones 2,5 mg/ml del análogo de timidina EdU (diluido en DMSO) por vía intraperitoneal 2h antes de su sacrificio. Tras el procesado de los tejidos de estos animales, se realizaron secciones de 10  $\mu$ m de bloques de OCT (apartado 9.2) que fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y permeabilizados con Tritón X-100 0,5% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 20 min. Se realizaron dos lavados con BSA al 3% en PBS entre cada uno de los pasos. Para la visualización de las células en división en estas secciones se siguió el protocolo indicado para la tinción del EdU en el “Click-iT® EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit” (Molecular Probes) (similar al del apartado 5.2).

## 9. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

### 9.1 FORMACIÓN DE BLOQUES DE PARAFINA

Los tejidos extraídos de los animales fueron fijados en formalina al 10% (Merck) durante 24h, siendo posteriormente deshidratados en baños progresivos de 1h de etanol al 70% (2 baños), 80%, 96% (2 baños) y 100% (3 baños) y, finalmente, se incubaron en 2 baños de xilol (Bio-Optica) de 1h cada uno. Las muestras se incluyeron en un baño de parafina líquida durante 2h. A continuación, se embebieron en soportes metálicos (Leica) rellenos con parafina a 56°C y el bloque se dejó enfriar hasta su solidificación. Una vez obtenidos, se cortaron en secciones de 5  $\mu$ m con un micrótopo (*Micrótopo Rotatorio Minot*, Leica), y se depositaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-Lisina (Thermo Scientific) para favorecer la adhesión del tejido.

### 9.2 GENERACIÓN DE BLOQUES DE OCT

Los bloques de OCT se generaron utilizando el medio “Optimal Cutting Temperature” (Tissue-Tek). Las muestras frescas se incluyeron y se orientaron en el soporte Tissue Teck (Dako) que se relleno con OCT, y se colocó sobre nieve carbónica. Una vez congelados, los bloques se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se cortaron en secciones de 10  $\mu$ m utilizando el criostato *Leica CM1950* y las secciones se depositaron en portaobjetos con poli-L-Lisina (Thermo Scientific) para su posterior análisis.

### 9.3 TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA (H&E)

Las secciones de tejido en parafina se desparafinaron comenzando con su incubación en estufa a 58-60°C durante 20 min. Seguidamente, los cortes se sometieron a 2 baños en xilol de 5 min y se rehidrataron en etanol a concentraciones decrecientes (2 baños al 100%, 2 baños al 96% y 2 baños al 70%) durante 5 min y, al final, en agua destilada. Las muestras se tiñeron con hematoxilina de Gill 2 (Thermo Scientific) durante 10 min a temperatura ambiente y el exceso de tinción se eliminó con un lavado en agua corriente de 5 min. A continuación, los cortes se trataron con alcohol ácido al 0,5% (se sumergieron en baño 5 veces) y con *bluing* para hacer virar la hematoxilina a un color morado (1 min). Tras un lavado en etanol al 70%, se llevó a cabo una contra-tinción con eosina (Thermo Scientific) durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de etanol (96% y 2 baños del 100%), se aclararon con xilol (10 min) y se montaron en DPX (Sigma-Aldrich).

En las secciones obtenidas mediante criostato, se realizó el mismo protocolo comenzando con la incubación en hematoxilina y 3 sumergidas en alcohol ácido al 0,5%.

## 10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

### 10.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WB

Los extractos proteicos se obtuvieron lisando las células durante 15-30 min en rotación con tampón de lisis (0,1% SDS, 0,5% deoxicolato sódico, 300 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 25 mM de HEPES pH 7.5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de EDTA, 20 mM β-glicerofosfato) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (cóctel de inhibidores, Sigma-Aldrich). En el caso de los tejidos, las muestras fueron, además, trituradas mecánicamente mediante congelación con nitrógeno líquido.

Los lisados se centrifugaron en frío a 14.000 r.p.m. durante 10 min y el sobrenadante se aisló para la evaluación de la concentración proteica mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva estándar de rango 2-10 mg/ml de BSA. Las muestras cuantificadas se guardaron a -20°C hasta su uso. Entre 20 µg (para proteínas transfectadas) y 40-50 µg de proteína (para proteínas endógenas) de los diferentes extractos se resolvieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE (concentración 10-15%). En todos los casos se usó un marcador de peso molecular "Precision Plus protein Dual color standards" (BioRad).

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0,45 µM (BioRad) utilizando tampón de transferencia (20% metanol, towbin salt SDS, 10% Tris-glicina pH 8.8) a 300 mA O/N. La unión inespecífica de anticuerpos a la membrana se bloqueó mediante incubación de

1h con tampón TBS-Tween (0,01%) conteniendo 5% de leche desnatada o tampón de bloqueo Odissey (Li-Cor). Las membranas se incubaron, a continuación, con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla MM-2) a 4°C O/N. Tras tres lavados de 5 min, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o a un fluoróforo de emisión en infrarrojo (Tabla MM-3), durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia usando el kit de detección “ECL Western Blotting Detection Reagents” (GE Healthcare) u Odissey (Li-Cor), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de la intensidad de la señal de las bandas mostradas en el WB fue realizada mediante el programa de análisis de imagen *Image J*.

### 10.2 ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Para el análisis por IF en líneas celulares, el cultivo se dejó crecer hasta alcanzar el 80% de confluencia sobre cristales de 10/12 mm de diámetro. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,2% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 15 min. Para minimizar la autofluorescencia y bloquear las uniones inespecíficas, incubamos con glicina 0,1 M durante 30 min y con BSA al 3% durante 1h, respectivamente. Todos los anticuerpos se incubaron en 3% BSA. Entre cada uno de los pasos, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min.

En el caso de dobles inmunofluorescencias, la incubación se realizó con ambos anticuerpos primarios al mismo tiempo, al igual que con los anticuerpos secundarios. Tras la incubación con 1 mg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Calbiochem) durante 10 min para la detección de ácidos nucleicos, las inmunofluorescencias se montaron con “Prolong Gold Antifade Trshrny” (Invitrogen). La visualización se realizó en un microscopio confocal *Leica TCS-SP5* del servicio de Microscopía Confocal (Campus de Majadahonda, ISCIII) usando los láseres con espectro de excitación correspondientes a 405 nm (para detección de DAPI y Hoechst), 488 nm y 561 nm. La configuración de los detectores y la captura de las imágenes se efectuaron con el programa *LAS AF* (“Leica Application Suite Advanced Fluorescence”). Las señales de diferentes fluoró cromos fueron tomadas de forma secuencial.

### 10.3 ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Las tinciones por IHQ se realizaron en secciones de 5 µm de grosor procedentes de muestras fijadas en formalina e incluidas en bloques de parafina (apartado 9.1). Tras su desparafinado, se procedió al desenmascaramiento de las muestras llevándolas a ebullición inmersas en tampón citrato 10 mM con pH 6 durante 15 min. Después de unos 20 min de

reposo a temperatura ambiente, se procedió al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena incubando los cortes con  $H_2O_2$  al 3% durante 15 min. Tras varios lavados en agua, las muestras se incubaron durante 30 min con 5% de suero de caballo para anticuerpos  $\alpha$ -conejo para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla MM-2) a 4°C O/N en cámara húmeda y con los secundarios durante 45 min a temperatura ambiente. Entre ambas incubaciones se realizaron, al menos, tres lavados de PBS-Tween 0,1%. La detección de los anticuerpos se realizó mediante el sistema Avidina/Estreptavidina-Peroxidasa utilizando el “Kit Vectastain ABC” (Vector Laboratories). El paso final se realizó añadiendo el substrato 3,3'diaminobencidina y  $H_2O_2$  (“Vector Peroxidase Substrate Kit”, Vector Laboratories). La reacción química se paró con agua en el momento deseado, controlando la reacción con el microscopio óptico. Posteriormente se realizó una contratinción convencional con hematoxilina y se montaron las preparaciones en DPX (Sigma-Aldrich). Las fotos obtenidas se realizaron en un microscopio *Nikon Eclipse 50i* con cámara acoplada.

TABLA MM-2. ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS.

Anticuerpos Primarios			
Anticuerpo	Especie (tipo)	Dilución WB/IF/IHQ	Procedencia
Anti-AU5	Ratón (mc)	1:1000/--/--	BAbCo
Anti-HA	Ratón (mc)	1:1000/--/--	BAbCo
Anti-MYC	Ratón (mc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti-Sur8	Conejo (pc)	1:1000/1:50/1:200	<i>generado en el laboratorio</i>
Anti-p42/44 (ERK1/2)	Ratón (pc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti-fosfo p42/44 (ERK1/2)	Conejo (pc)	1:1000/--/--	Cell Signalling
Anti-AKT	Ratón (mc)	1:1000/--/--	Cell Signalling
Anti-fosfo AKT (S473)	Conejo (pc)	1:1000/--/--	Cell Signalling
Anti- $\beta$ -Actina	Ratón (mc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti- $\beta$ -Tubulina	Ratón (mc)	1:1000/--/--	Sigma-Aldrich
Anti-B RAF	Ratón (pc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti-MEK1	Ratón (pc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti-Receptor de Transferrina	Ratón (mc)	1:1000/--/--	Zymed
Anti-Caveolina	Ratón (mc)	1:5000/--/--	BD Biosciences
Anti-p65	Conejo (mc)	--/1:100/--	Abcam
Anti-Lámina B	Cabra (pc)	1:1000/--/--	Santa Cruz
Anti-CSTF3	Conejo (pc)	1:1000/--/--	Novus
Anti-TMG cap	Conejo (mc)	--/1:100/--	Dr. Miguel Lafarga
Anti-Ki67	Conejo (pc)	--/--/prediluido	Master Diagnostica
Anti-PCNA	Ratón (mc)	1:300/--/--	Santa Cruz
Anti-K10	Conejo (pc)	1:1000/--/1:1000	Covance

pc: anticuerpo policlonal; mc: anticuerpo monoclonal



TABLA MM-3. ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS.

Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Especie	Aplicación WB/IF	Procedencia
Anti-ratón-HRP	Oveja	1:10000/--	GE Healthcare
Anti-conejo-HRP	Burro	1:5000/--	GE Healthcare
Anti-cabra-HRP	Burro	1:10000/--	Santa Cruz
Anti-ratón-800	Cabra	1:10000/--	Odissey
Anti-conejo-680	Cabra	1:5000/--	Odissey
Anti-conejo Texas Red	Cabra	--/1:500	Molecular Probes
Anti-ratón FITC 488	Cabra	--/1:500	Molecular Probes
Anti-conejo FITC 488	Cabra	--/1:500	Molecular Probes
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Cabra	--/1:500	Invitrogen
Anti-conejo Alexa Fluor 647	Cabra	--/1:500	Invitrogen

Espectros de emisión = 488 nm: fluorescencia verde; 594 nm: fluorescencia roja; 647 nm: fluorescencia rojo lejano

#### 10.4 ANÁLISIS PROTEÓMICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Para el estudio de Sur8 en el núcleo celular, se realizó una IP siguiendo el protocolo del apartado 4.2 pero con algunas modificaciones: la IP en HEK 293T, transfectadas con 6 µg de pCEFL-KZ-HA-Sur8, se realizó con el kit de Myltenyi empleando α-HA. Como control del ensayo se usaron células HEK 293T sin transfectar que se sometieron al mismo protocolo de IP. En el caso de las RT112 FGFRI, el ensayo se realizó usando α-Sur8 para la IP del Sur8 endógeno y suero preinmune de conejo como control.

Las muestras inmunoprecipitadas se resolvieron por WB. El gel de acrilamida obtenido y los siguientes análisis, fueron realizados por el grupo del Dr. Ignacio Casal (CIB). Del gel de las células RT112 FGFRI, se tomaron 6 fracciones, dejando las fracciones correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas. Del gel obtenido de las células HEK 293T, sí se tomaron las 8 fracciones. Las fracciones se digirieron con tripsina y los péptidos fueron separados por gradiente en un *nanoEasy HPLC*. El espectro de masas fue adquirido con *linear trap quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos*. El espectro de masas fue analizado usando *SEQUEST search engine* con *Proteome Discoverer*. Los datos fueron completados usando *MASCOT search engine*.

### 11. ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO

#### 11.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE CDNA

El RNA se extrajo mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987, utilizando el reactivo “Trizol” (Ambion). Las células, cultivadas en placas P60 (Falcon) al 70-80% de confluencia, fueron recogidas con 1 ml de Trizol. A continuación, siguiendo las instrucciones de

la casa comercial, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, centrifugándose durante 15 min a 14.000 r.p.m. La fase superior se aisló y se añadieron 0,5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA. Tras la precipitación, los tubos se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Después de otra centrifugación, se eliminó el etanol y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA se resuspendió en unos 50 µl de agua libre de nucleasas. La cantidad y calidad del RNA se evaluó con un espectrofotómetro (“ND-1000”, Nano-Drop).

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se siguieron las instrucciones del kit “Ready-To-Go You-Prime First-Strand beads” (GE Healthcare). Para la reacción se mezcló en el tubo que contiene bolas liofilizadas con todos los elementos necesarios para la reacción, una solución con 1 µg del RNA total extraído y *random primers* como cebadores. La mezcla se mantuvo 1h a 37°C, tal y como describe el fabricante.

### **11.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)**

Para la realización de los análisis de qRT-PCR se empleó el reactivo SYBR Green del kit “Go Taq qPCR Master mix” (Promega), utilizando una pareja de cebadores específicos contra los genes de interés a una concentración de 0,5 µM (Tabla MM-4). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *7500 Fast* (Applied Biosystems) asociado al programa *7500 software* V2.0.6. El análisis de la expresión de cada gen se llevó a cabo por triplicado con 20 ng de cDNA por punto. Las condiciones fueron las mismas para todos los genes analizados:

- 20 seg a 95°C
- (3 seg a 95°C, 30 seg a 60°C) x 40 repeticiones
- (15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 15 seg 95°C, 15 seg 60°C) para la curva de fusión

La expresión génica se calculó mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ , determinando el número de copias del gen de interés normalizando cada gen frente a la expresión de un gen constitutivo, como GAPDH o  $\beta$ actina.

TABLA MM-4. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA qRT-PCR.

Gen	Oligonucleótido FW (5'-3')	Oligonucleótido RW (5'-3')
<i>Sur8</i>	GTAAAGGGTCTGGCAAGCAA	AATGGTCCTGGTCAGCTCAT
<i>PCNA</i>	TGGATAAAGAAGAGGAGGCG	GGAGACAGTGGAGTGGCTTT
<i>Ciclina D1</i>	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG	GGGTGGGTTGGAAATGAAC
<i>Ciclina D2</i>	ACACACTCACGTGTGATGCC	CAGAGCTTCGATTGCTCCT
<i>p16</i>	CGTGAACATGTTGTTGAGGC	GCAGAAGAGCTGCTACGTGA
<i>p19</i>	TTCTTCATCGGGAGCTGGT	TCAGGAGCTCCAAAGCAACT
<i>p53</i>	CTAGCATTGAGGCCCTCATC	TCCGACTGTGACTCCTCCAT
<i>p21</i>	CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA	ATCACCAGGATTGGACATGG
<i>K5</i>	CAGAGCTGAGGAACATGCAG	CACAACTCATTCTCAGCCG
<i>K1</i>	AGTTTGCCTCCTTCATCGAC	TTGTGGTGTCTACCTGCTGC
<i>K10</i>	GGTACGAGAAGCAAGGCAAC	TGTCAGTTGTCAGGGTGAGG
<i>Loricrina</i>	TCCCTCACTCATCTCCCTG	GGTCTTCCACAACCCACAG
<i>Involucrina</i>	CAGGAGTCACATGAGCCAGA	TATCTGTTGCTGCTGCTGCT
<i>IL-6</i>	TGATGCACTTGCAAGAAACA	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAAGT
<i>S100A9</i>	TCAGACAAATGGTGGAAGCA	GTCCAGGTCCTCCATGATGT
<i>TSLP</i>	TTCACTCCCCGACAAAACAT	GCCATTTCTGAGTACCGTC
<i>GAPDH</i>	CGTCCCGTAGACAAAATGGT	TTGATGGCAACAATCTCCAC
<i>SUR8</i>	TGCTTAGCATTGAGAGAAACA	GATTGTGAGCTACATCCAGCG
<i>GAPDH</i>	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	AATGAAGGGGTCATTGATGG
<i><math>\beta</math>ACTINA</i>	GCACAGAGCCTCGCCTT	GTTGTCGACGACGAGCG

En verde se muestran las secuencias de los cebadores de los genes humanos analizados.

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando la prueba “t de student” para dos muestras independientes, considerando significativos valores a partir de  $p < 0.05$  (\*). Los valores se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar del número de réplicas indicadas.

Para los análisis de los resultados de las qRT-PCR, se empleó el programa *REST (Relative Expression Software Tool)* que compara los valores de varios genes diana entre dos grupos, muestra problema y muestra control.



# RESULTADOS

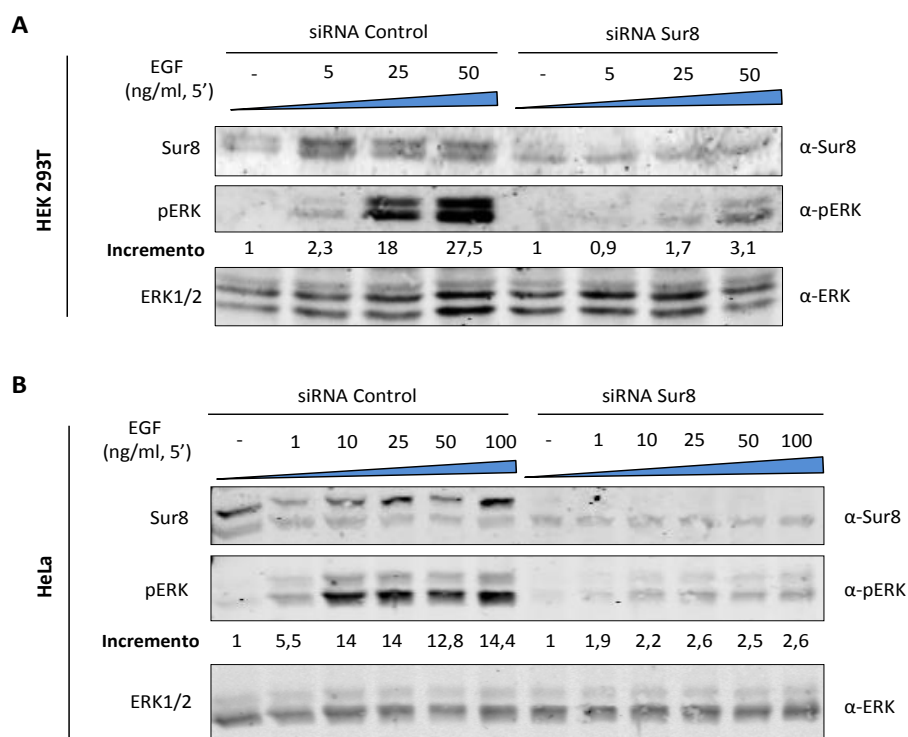


## 1. PAPEL DE SUR8 EN DIFERENTES PROCESOS CELULARES

### 1.1 SUR8 ES NECESARIO PARA MANTENER LA FOSFORILACIÓN DE ERK INDUCIDA POR FACTORES DE CRECIMIENTO

Para estudiar la importancia de Sur8 en la fisiología celular, en colaboración con el laboratorio del Dr. J. Silvio Gutkind (NIH), realizamos ensayos de silenciamiento génico para eliminar la expresión endógena de Sur8. Para ello, usamos varios tipos de líneas celulares en los que transfectamos un siRNA control o un cóctel de siRNA específicos de Sur8.

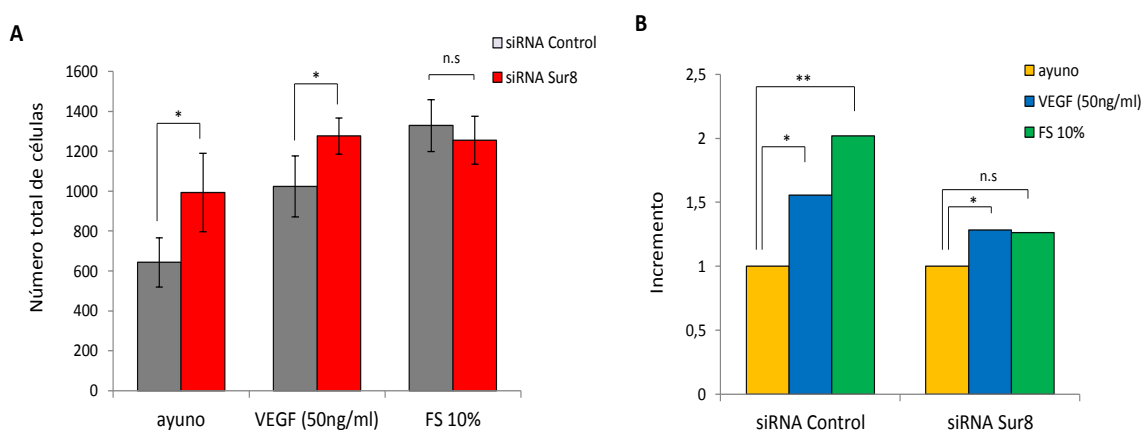
Los resultados en la Figura R-1, muestran la reducción de la expresión endógena de Sur8 en las diferentes líneas celulares. Como era esperable por resultados previos, la fosforilación de ERK disminuye cuando eliminamos Sur8, aunque la intensidad de reducción depende del tipo celular. En HEK 293T, vemos una disminución drástica de los niveles de pERK (Fig. R-1A). En el caso de células HeLa, se muestra también el descenso de la expresión de Sur8 tras el silenciamiento con los siRNAs Sur8, y la reducción en la cantidad de ERK fosforilado (Fig. R-1B).



**FIGURA R-1. SUR8 ES NECESARIO PARA MANTENER LA FOSFORILACIÓN DE ERK INDUCIDA POR FACTORES DE CRECIMIENTO.** Transfección de células HEK 293T (A) y HeLa (B) con un siRNA control o un cóctel de siRNAs específicos de Sur8. Las células se estimularon durante 5 min con concentraciones crecientes de EGF, tras un periodo de ayuno de 6h. La detección por WB se realizó con anticuerpos específicos α-pERK, α-ERK y α-Sur8. En cada WB se muestra el incremento obtenido de la cuantificación de la intensidad de señal de pERK, respecto a la intensidad de la señal de ERK total en cada punto. El experimento fue reproducido tres veces con resultados similares.

### 1.2 LA DEPLECIÓN DE SUR8 AUMENTA LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE CÉLULAS HUVEC

Al observar que tanto células HUVEC como HeLa, transfectadas con siRNA específicos de Sur8, se adherían más fuertemente a la placa respecto a las células control (datos no mostrados), decidimos analizar la capacidad de adhesión de estas células en presencia de diferentes estímulos, empleando colágeno como sustrato. Como se muestra en la Figura R-2A, estímulos como VEGF y FS incrementan la adherencia de las células HUVEC transfectadas con el siRNA control con respecto a las mismas células en ayuno. Por el contrario, en las células transfectadas con siRNAs Sur8, hay un mayor número de células adheridas a la placa tanto en ayuno como en estimulación con VEGF. En la Figura R-2B se compara la capacidad de ambos tipos de células para responder a los diferentes estímulos, y vemos como las células tratadas con siRNAs Sur8 no responden correctamente a la presencia de los factores de crecimiento, produciendo un menor incremento en su capacidad de adhesión respecto del basal en ausencia de estímulos.



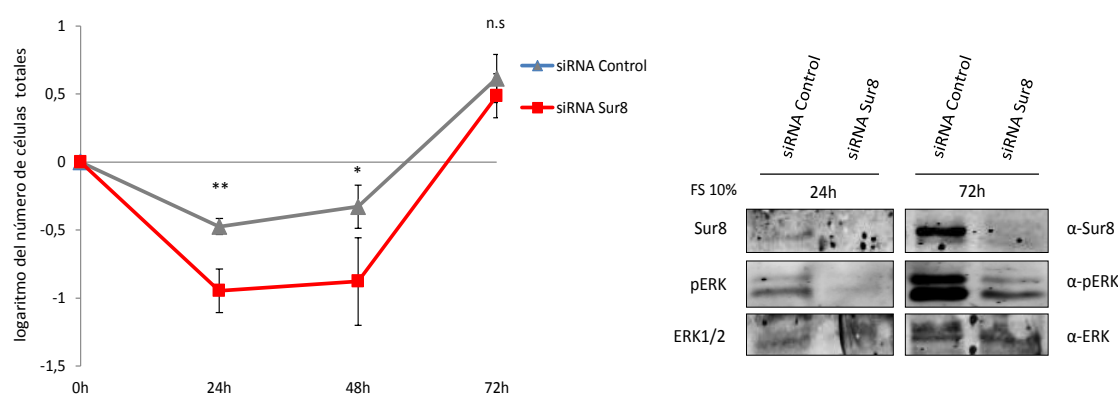
**FIGURA R-2. LA DEPLECIÓN DE SUR8 AUMENTA LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE CÉLULAS HUVEC.** (A) Cuantificación del ensayo de adhesión celular a colágeno tipo I con células HUVEC, 48h después de su transfección con siRNAs control o con siRNAs Sur8. En el gráfico se muestra el número de células adheridas a la placa después de un periodo de 15 min en cada una de las condiciones: ayuno (18h), VEGF (50 ng/ml) o FS 10%, partiendo del mismo número de células; (B) Incremento de la capacidad de adhesión de las células siRNAs control o siRNAs Sur8 con los diferentes estímulos respecto a su ayuno. Más de 3.000 células fueron examinadas en cada caso. Los valores pertenecen a un experimento representativo de dos experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar. \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , n.s: no significativo.

### 1.3 SUR8 INTERVIENE EN EL PROCESO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HUVEC

Para estudiar si la capacidad proliferativa de las células se ve afectada por la ausencia de Sur8, realizamos una curva de crecimiento de células HUVEC durante 3 días en condiciones normales de cultivo. Los resultados muestran que en las primeras 24h, en la población hay



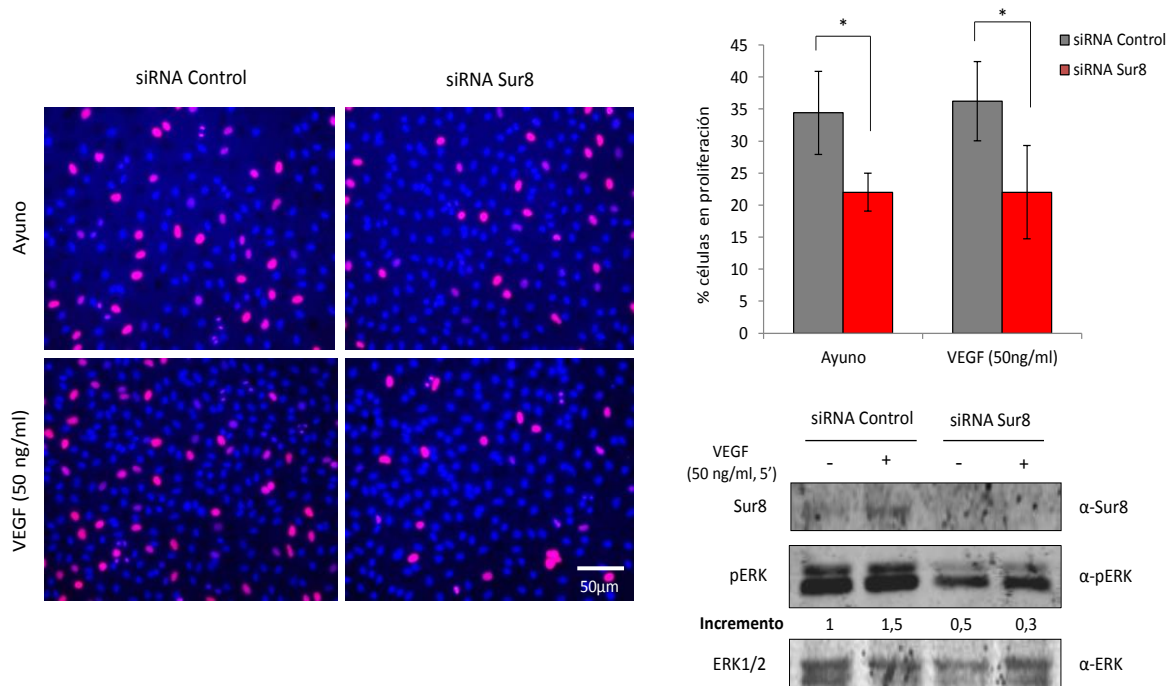
un descenso en el número de células, tanto en las transfectadas con siRNA control como con siRNAs Sur8, probablemente por la propia técnica de transfección de los siRNA. Sin embargo, el descenso es aún más pronunciado en las células con siRNAs Sur8. A las 48h, ambas poblaciones comienzan a recuperarse, manteniendo, no obstante, las diferencias en el número celular entre la población control y la tratada con siRNAs Sur8. Al tercer día, no existen diferencias significativas en el número total de células (Fig. R-3). En el WB se detecta el descenso de Sur8 junto a una disminución en la fosforilación de ERK tanto en el primer día como en el tercero (Fig. R-3). En concordancia con este resultado, en todos los diferentes experimentos siempre hemos cuantificado un menor número de células en las placas transfectadas con siRNAs Sur8.



**FIGURA R-3. LA ELIMINACIÓN DE SUR8 REDUCE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HUVEC.** (Izquierda) células HUVEC, mantenidas en FS 10% durante todo el ensayo, fueron transfectadas con un siRNA control o siRNAs Sur8. Se muestra la media en escala logarítmica del número de células totales contabilizadas en tres pocillos independientes a lo largo de 3 días, respecto a las células contabilizadas en tiempo 0. Las barras representan la desviación estándar. \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , n.s.: no significativo. (Derecha) se muestran los lisados celulares de los días 1 (24h) y 3 (72h) que fueron analizados por WB usando los anticuerpos primarios  $\alpha$ -Sur8,  $\alpha$ -pERK y  $\alpha$ -ERK. Experimento representativo de dos ensayos independientes con similar resultado.

Analizamos también la proliferación de células HUVEC cuantificando las células que se encuentran en división después de la supresión de Sur8. Para ello empleamos el kit *Click-it assay* (Invitrogen), que marca las células que se encuentran en la fase de síntesis de DNA durante el ciclo celular. Como se muestra en la Figura R-4, no se aprecia un incremento de proliferación inducida por VEGF tras estimulación. Sin embargo, el número de células en fase S es mayor en las células transfectadas con siRNA control, tanto en ayuno como en estimulación, en comparación con las transfectadas con siRNAs Sur8. Aunque la expresión de Sur8 es apenas perceptible por WB, sí es detectable el efecto del silenciamiento por el descenso en la fosforilación de ERK. Esta reducción parece ser independiente de la estimulación con VEGF,

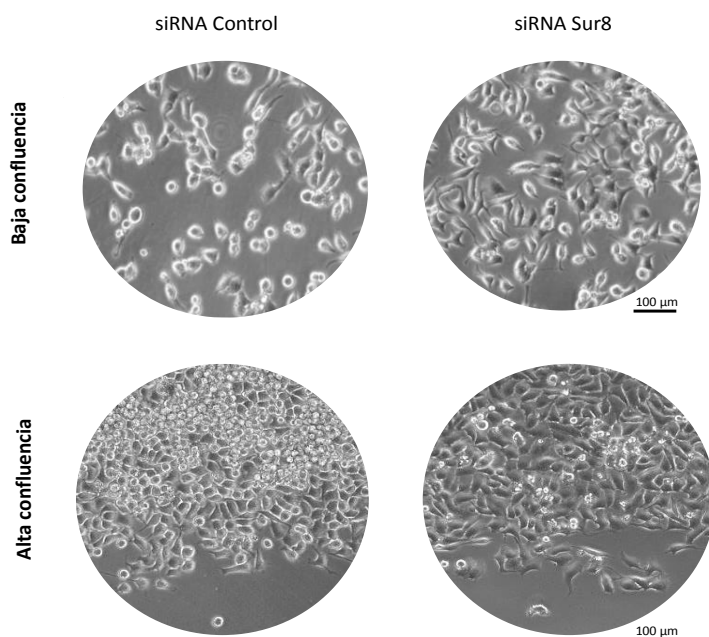
debido a que estas células son capaces de secretar VEGF de forma endógena, manteniendo unos niveles basales de pERK muy elevados.



**FIGURA R-4. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS HUVEC SIN SUR8.** Imágenes de microscopía de fluorescencia resultantes del ensayo *Click-it* de proliferación en células HUVEC, transfectadas con siRNA control o siRNAs Sur8. El ensayo se realizó en condiciones de ayuno (16h) o estimulación con VEGF (50 ng/ml, 16h). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y el marcaje de las células en fase S se realizó por detección de la incorporación de EdU al DNA con α-Alexa Fluor 594 (rosa), tras un pulso de 6h. A la derecha, en el histograma se muestra la media del porcentaje del número de células en división de dos experimentos independientes, respecto al total de células en cada una de las condiciones. Las barras representan la desviación estándar. \*\*:  $p < 0.01$ , n.s: no significativo. En los experimentos fueron cuantificadas más de 800 células por condición y tratamiento. También se muestra el análisis por WB de estas células usando los anticuerpos primarios α-Sur8, α-pERK y α-ERK, y el incremento obtenido de la cuantificación de la intensidad de señal de pERK, respecto a la señal de ERK total en cada punto.

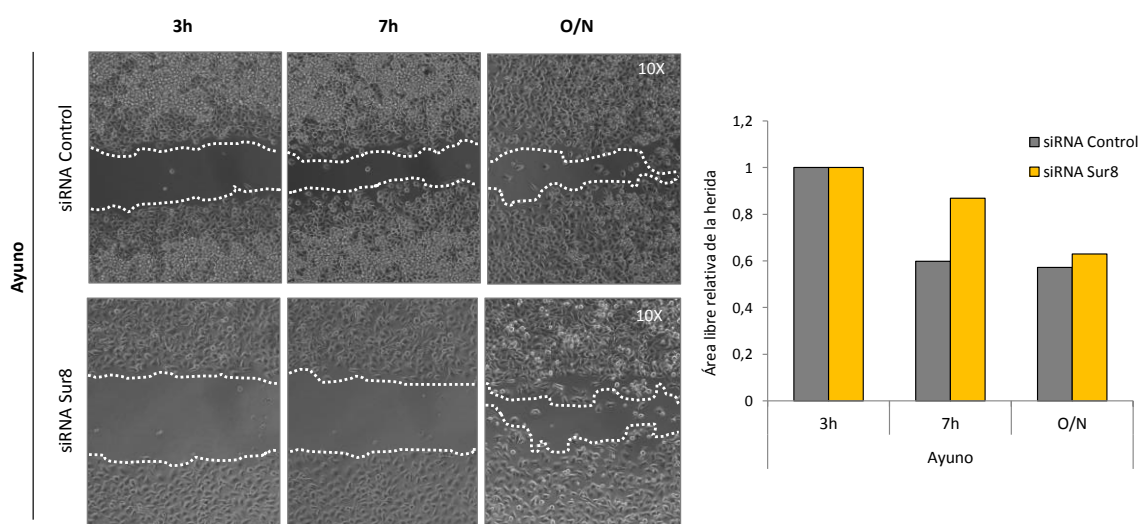
#### 1.4 SUR8 ES ESENCIAL PARA LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS EN HELA

Al realizar el silenciamiento génico en células HeLa, observamos como las células en las que suprimimos la expresión de Sur8 adquieren una morfología retorcida o estrellada en comparación con las células control (Fig. R-5).

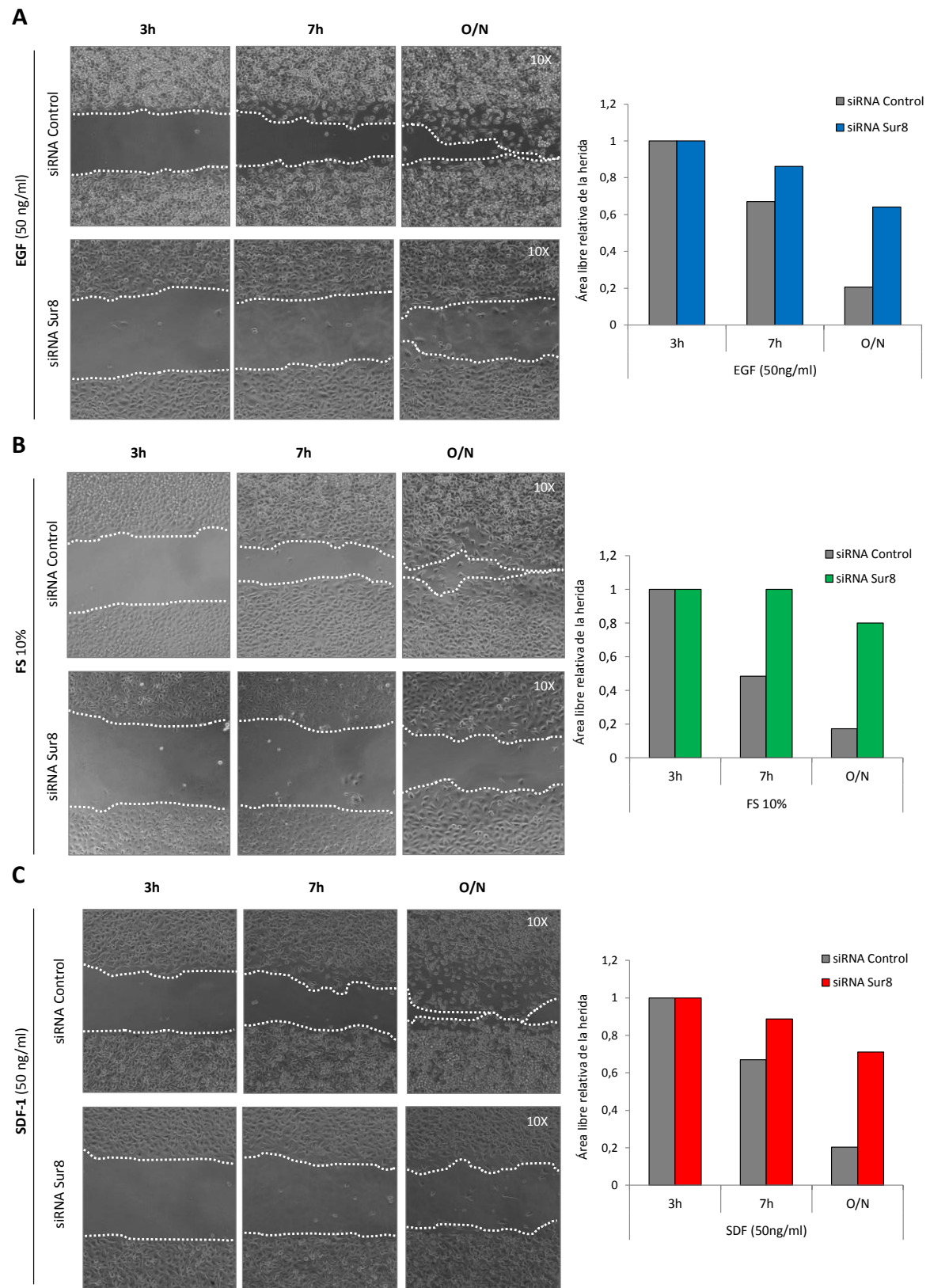


**FIGURA R-5. LA ELIMINACIÓN DE SUR8 MODIFICA LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS HELA.** Imágenes de microscopio óptico de células HeLa, 24h después de su transfección con siRNAs control o contra Sur8, en condiciones normales de cultivo (paneles superiores) o crecidas en alta confluencia sobre cristales tratados con colágeno tipo I (paneles inferiores).

Evaluamos entonces si la capacidad de movilidad de las células HeLa se veía afectada al reducir los niveles endógenos de Sur8. Mediante el ensayo de herida, observamos que las células con siRNAs Sur8 parecen tener reducida ligeramente su capacidad migratoria en condiciones de ayuno (Fig. R-6). Sin embargo, bajo condiciones de estimulación con EGF (Fig. R-7A), FS (Fig. R-7B) o SDF-1 (factor 1 derivado de células del estroma, Fig. R-7C), la incapacidad de las células para migrar es mucho más acentuada. Son destacables los resultados con SDF-1, dado que esta quimiocina se une a GPCRs, diferentes de los RTKs a los que clásicamente se ha ligado la función de Sur8.



**FIGURA R-6. MIGRACIÓN DE CÉLULAS HELA, CON O SIN SUR8, EN CONDICIONES DE AYUNO.** Imágenes de microscopio óptico de células HeLa crecidas en alta confluencia sobre cristales tratados con colágeno tipo I, en medio de ayuno con 0,5% BSA. Las fotografías se tomaron a las 3h, 7h y O/N de realizar la herida. En el histograma se representa la cuantificación del área libre de células que queda en la herida a lo largo del tiempo en el caso de células sin Sur8 o células control. Experimento representativo de dos ensayos independientes. Aumento 10X.



**FIGURA R-7. SUR8 ES ESENCIAL PARA LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR ESTÍMULOS EN CÉLULAS HELa.** Imágenes de microscopio óptico de células HeLa a las 3h, 7h y O/N de realizar la herida. Células tratadas con EGF (50 ng/ml) (A), FS 10% (B) o SDF-1 (50 ng/ml) (C), en medio 0,5% BSA-DMEN y crecidas en alta confluencia sobre cristales con colágeno tipo I. En los histogramas se representa la cuantificación del área libre de células que queda en la herida a lo largo del tiempo en el caso de células sin Sur8 o células control. Experimento representativo de dos ensayos independientes. Aumento 10X.

Al realizar este ensayo de migración en células HUVEC, vemos que no hay diferencias en la capacidad migratoria entre las células con o sin Sur8 en condiciones de ayuno. Sin embargo, la migración estimulada por la presencia de VEGF, FS o S1P (esfingosina-1-fosfato, ligando extracelular para GPCRs), es impedida en las células transfectadas con siRNAs Sur8, ya que se induce muerte celular en estas condiciones (Anexo 1).

## 2. IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SUR8

Quisimos investigar si la correcta localización de Sur8 es clave para regular la intensidad de la señal de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK o si sus diferentes localizaciones dentro de la célula son claves para el desarrollo de distintas funciones.

### 2.1 EL MUTANTE PUNTUAL SUR8 S2G NO INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE ERK

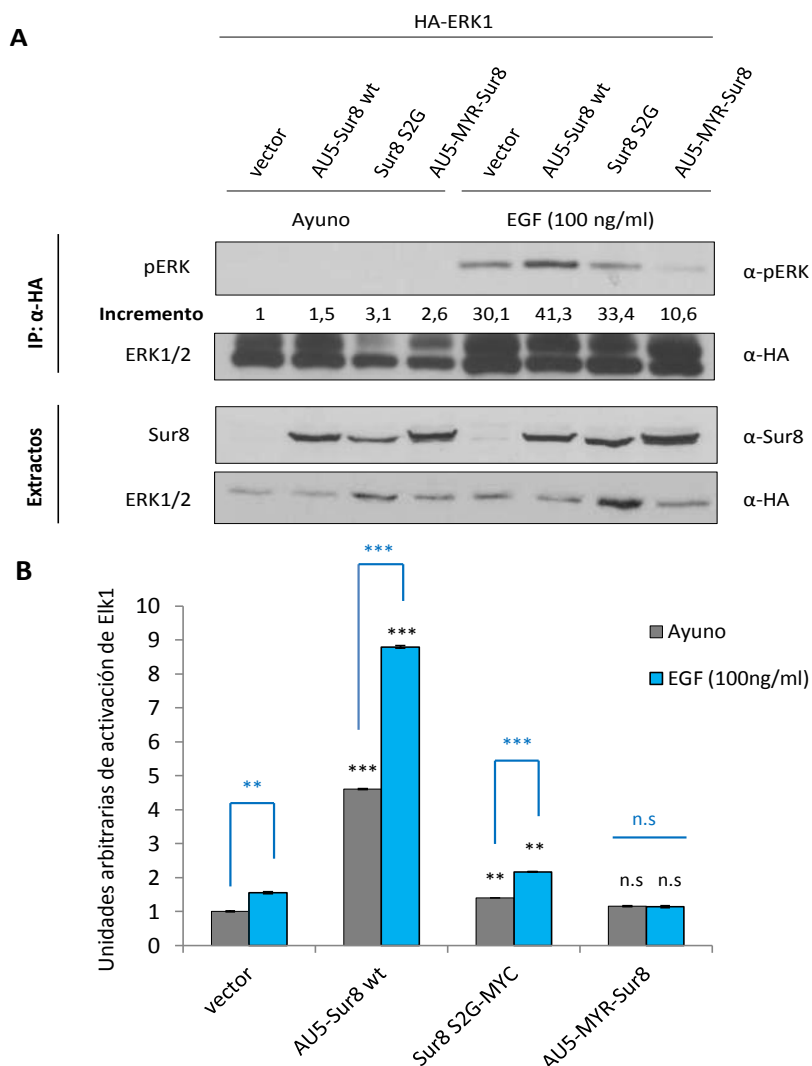
Resultados previos del laboratorio demuestran que la proteína de fusión MYR-Sur8, que contiene la secuencia de N-miristoilación de la proteína Src, inhibe la activación de ERK inducida por FGF y EGF, acompañado de un cambio de localización de Sur8 hacia dominios de balsas lipídicas de la membrana plasmática (León, G. 2010). Por otro lado, Cordeddu *et al.* (2009) describen que una mutación puntual en el codón codificante de la serina en posición 2 de Sur8 con cambio a glicina en el mutante, encontrada en pacientes de un tipo de síndrome de *Noonan* con pérdida de cabello anágeno, genera un sitio de miristoilación para esta proteína capaz de sobrepotenciar la vía de ERK. Con el objetivo de intentar explicar las diferencias entre estos resultados, empleamos distintas aproximaciones.

Empezamos por la obtención del mutante Sur8 S2G mediante mutagénesis dirigida, que fue clonado en un plásmido con epítipo MYC en el extremo carboxilo para evitar que este interfiera con la miristoilación que afecta al segundo aminoácido de Sur8 en el extremo N-terminal, tal como aparece en pacientes. Paralelamente, generamos también este mutante sin ningún epítipo. Una vez obtenidos, comprobamos los efectos de su sobreexpresión sobre la activación de ERK en células HEK 293T, tras estimulación con EGF. Como se muestra en la Figura R-8A, la proteína Sur8 S2G no es capaz de incrementar la fosforilación de ERK, al contrario de lo que ocurre con Sur8 wt, pero tampoco de inhibir su fosforilación como sí sucede con MYR-Sur8.

Para corroborar estos resultados, realizamos un ensayo de activación transcripcional de Elk1 (Gal4-Elk1/Luc) con el gen reportero de la enzima Luciferasa. En la Figura R-8B, vemos como en las células Cos7, la sobreexpresión de la construcción Sur8 wt induce un aumento en

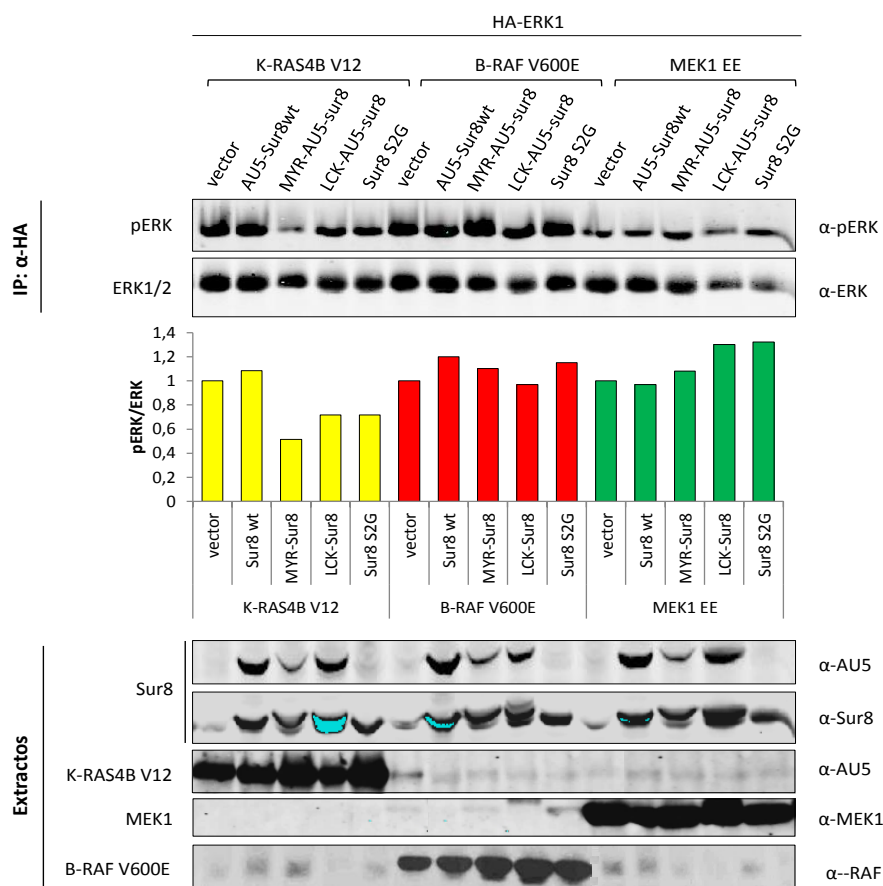


la actividad de Gal4-Elk1, mientras que la proteína de fusión MYR-Sur8 induce un descenso de la actividad luciferasa. El mutante Sur8 S2G, en comparación, induce solamente una ligera activación de Gal4-Elk1 tras estimulación con EGF.



**FIGURA R-8. EL MUTANTE PUNTUAL SUR8 S2G NO INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE ERK.** (A) Células HEK 293T transfectadas con la construcción pCEFL-KZ-HA-ERK1 junto a vector vacío, pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pCEFL-KZ-Sur8 S2G o pCEFL-KZ-MYR-AU5-Sur8. Tras 16h de ayuno, la estimulación se realizó con EGF (100 ng/ml) durante 10 min. Los inmunoprecipitados (IP) α-HA fueron resueltos por WB para detectar los niveles de p-ERK y ERK1/2. En los extractos totales se valoró la cantidad de Sur8 y de ERK1 transfectados con anticuerpos α-Sur8 y α-HA, respectivamente. Los niveles de fosforilación de ERK, respecto la cantidad de ERK total de cada punto, se representan como el “incremento” en el WB. Estos ensayos fueron reproducidos tres veces con resultados similares; (B) Células Cos7 transfectadas con los plásmidos pCDNAIII-Gal4-Elk1, pGal4-Luc y pRL-TK junto con vector vacío, pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pEF1-Sur8 S2G-MYC o pCEFL-KZ-MYR-AU5-Sur8. Tras 16h de ayuno, se estimularon con EGF (100 ng/ml) durante 6 horas. En la gráfica se representan los valores de actividad luciferasa, normalizados con la actividad Renilla de cada extracto celular y expresado como inducción respecto del valor de las células transfectadas con vector vacío en ayuno. Dicho histograma corresponde a la media y desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. La estadística se realizó comparando los valores obtenidos con las distintas construcciones sobreexpresadas en ayuno respecto al valor de las células con vector en ayuno, los valores en estimulación se analizaron frente a las células transfectadas con vector y estimuladas con EGF. Los asteriscos en color azul muestran el resultado del análisis estadístico entre los valores de cada construcción en ayuno frente a estimulación. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , n.s: no significativo.

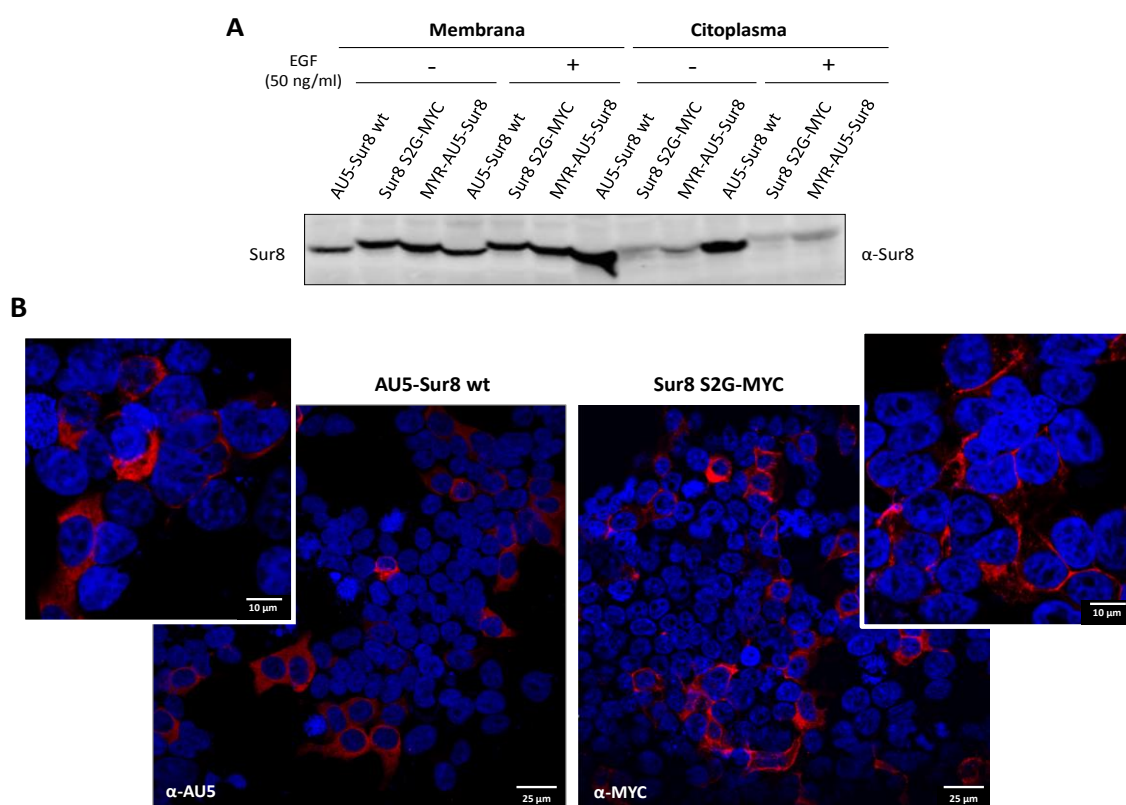
Investigamos en qué nivel de la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK el mutante puntual Sur8 S2G está dejando de ejercer su función y reduciendo, consecuentemente, la activación de ERK. Para ello, transfectamos formas hiperactivas de las proteínas clave de la vía: K-RAS4B V12, B-RAF V600E y MEK1 EE. La Figura R-9 sugiere que la sobreexpresión de Sur8 S2G bloquea la fosforilación de ERK inducida por K-RAS hiperactivo. Este resultado iría en concordancia con la función adaptadora de Sur8 descrita favoreciendo la activación de RAF, a través de su interacción con RAS, para dar lugar a la activación de ERK. El resto de proteínas hiperactivas, que actúan por debajo de este punto de la cascada, sí son capaces de mantener la fosforilación de ERK independientemente de cual sea la construcción de Sur8 sobreexpresada. Además, observamos que el comportamiento de la proteína Sur8 S2G es comparable a MYR-Sur8 y a la proteína de fusión de Sur8 con la región N-terminal de miristoilación de LCK (*Leukocyte-specific protein tyrosine Kinase*) (LCK-Sur8), que posee un comportamiento y localización similar a MYR-Sur8 (León, 2010).



**FIGURA R-9. EL MUTANTE SUR8 S2G BLOQUEA LA FOSFORILACIÓN DE ERK INDUCIDA POR RAS HIPERACTIVO.** Células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-HA-ERK1 junto a vector vacío, pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pCEFL-KZ-MYR-AU5-Sur8, pCEFL-KZ-AU5-LCK-Sur8 o pCEFL-KZ-Sur8 S2G, se cotransfectaron con pCEFL-KZ-AU5-K-RAS4B V12, pMCEF-B-RAF V600E o pCDNIII-MEK1 EE. Los inmunoprecipitados (IP) α-HA fueron resueltos por WB con anticuerpos específicos α-pERK, α-ERK y α-AU5 o α-Sur8 para detectar los niveles de p-ERK, ERK1/2 y las distintas construcciones de Sur8. Los niveles de fosforilación de ERK, respecto la cantidad de ERK total de cada punto, se representan en el histograma. Estos ensayos fueron reproducidos tres veces con similares resultados.

## 2.2 SUR8 S2G SE LOCALIZA PRINCIPALMENTE EN BALSAS LIPÍDICAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA

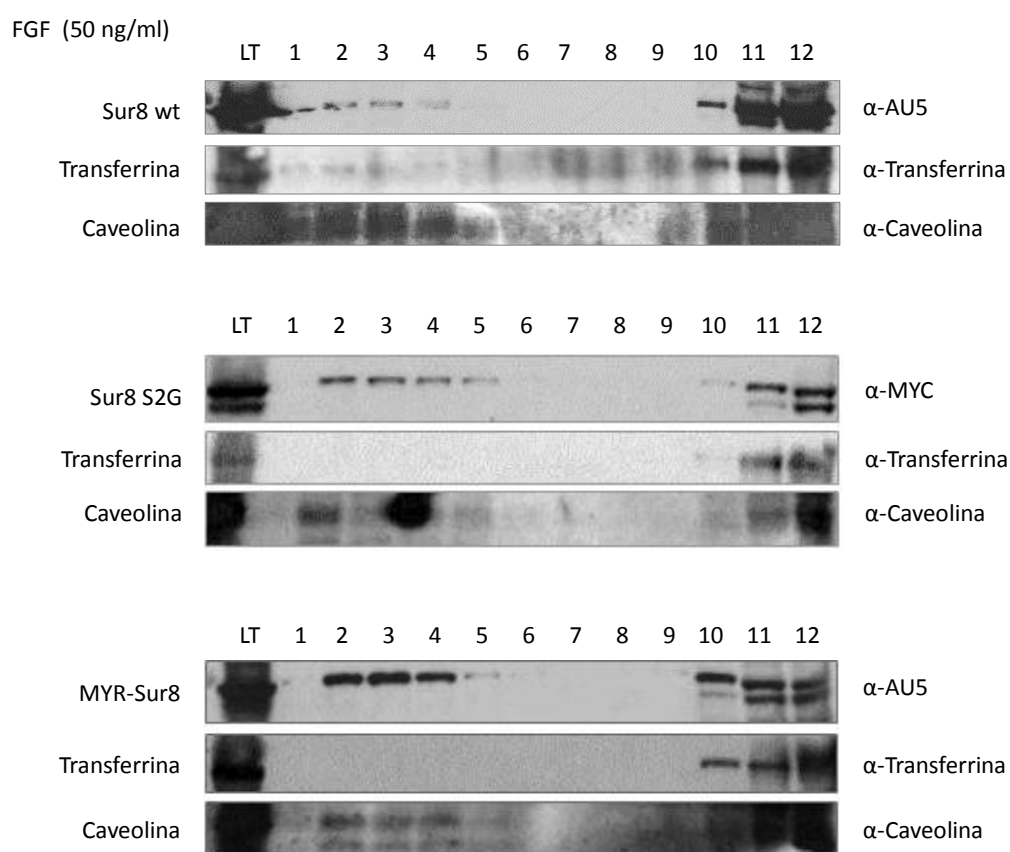
Para comprobar si un cambio en la localización celular pudiese ser la responsable de la incapacidad del mutante puntual Sur8 S2G para potenciar la activación de ERK, estudiamos su localización mediante ensayos de separación membrana/citoplasma en condiciones de ayuno y estimulación con EGF. En la Figura R-10A, vemos como Sur8 wt se localiza principalmente en la fracción citoplasmática en células HEK 293T, aunque también existe una proporción en membrana plasmática. La proteína de fusión MYR-Sur8 solo aparece en membrana y el mutante Sur8 S2G, igualmente, se encuentra presente únicamente en esta misma fracción tanto en ayuno como con EGF. Por otro lado, realizamos inmunofluorescencias en células HeLa transfectadas con Sur8 wt y Sur8 S2G. En las imágenes de microscopía confocal (Fig. R-10B), observamos, al igual que en el anterior ensayo, que la localización de Sur8 wt es principalmente citoplasmática. Sin embargo, el mutante Sur8 S2G posee un patrón más periférico que sugiere una localización asociada a regiones de membrana plasmática, de forma similar a la distribución de MYR-Sur8 (León, 2010).



**FIGURA R-10. SUR8 S2G SE LOCALIZA PRINCIPALMENTE EN REGIONES DE MEMBRANA PLASMÁTICA.** (A) Separación membrana/citoplasma de los lisados de células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pEF1-Sur8S2G-MYC o pCEFL-KZ-MYR-AU5-Sur8. Las células se tuvieron en ayuno durante 16h antes de la estimulación con EGF (50 ng/ml, 10 min). La detección de las diferentes proteínas se realizó empleando el anticuerpo  $\alpha$ -Sur8. Experimento realizado dos veces con similar resultado; (B) Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt o pEF1-Sur8 S2G-MYC y estimuladas con EGF (50 ng/ml, 10 min), tras 16h de ayuno. Se muestran dos imágenes a diferente aumento para cada una de las construcciones. Para la detección de Sur8 wt se utilizó  $\alpha$ -AU5 y para Sur8 S2G  $\alpha$ -MYC, seguidos de  $\alpha$ -ratón Alexa Fluor 594 como anticuerpo secundario.



Para definir en qué regiones concretas de la membrana plasmática se encuentran localizadas estas proteínas, complementamos los resultados anteriores realizando ensayos de separación de microdominios de membrana por gradientes de sacarosa. Debido a que los compartimentos de membrana desorganizada y los de balsas lipídicas poseen una composición diferente en lípidos, podemos separarlos por su distinta densidad y detectar las proteínas asociadas a estos compartimentos. Los ensayos se realizaron en células HEK 293T transfectadas con Sur8 wt, Sur8 S2G o MYR-Sur8. Los resultados obtenidos, tras estimulación con FGF (Fig. R-11) o EGF (Anexo 2), muestran como las proteínas Sur8 S2G y MYR-Sur8 se localizan preferentemente en las fracciones de menor densidad, junto a la caveolina (marcador de balsas lipídicas). Mientras, la proteína Sur8 wt aparece mayoritariamente en las fracciones correspondientes a membrana desorganizada, junto con el receptor de transferrina.

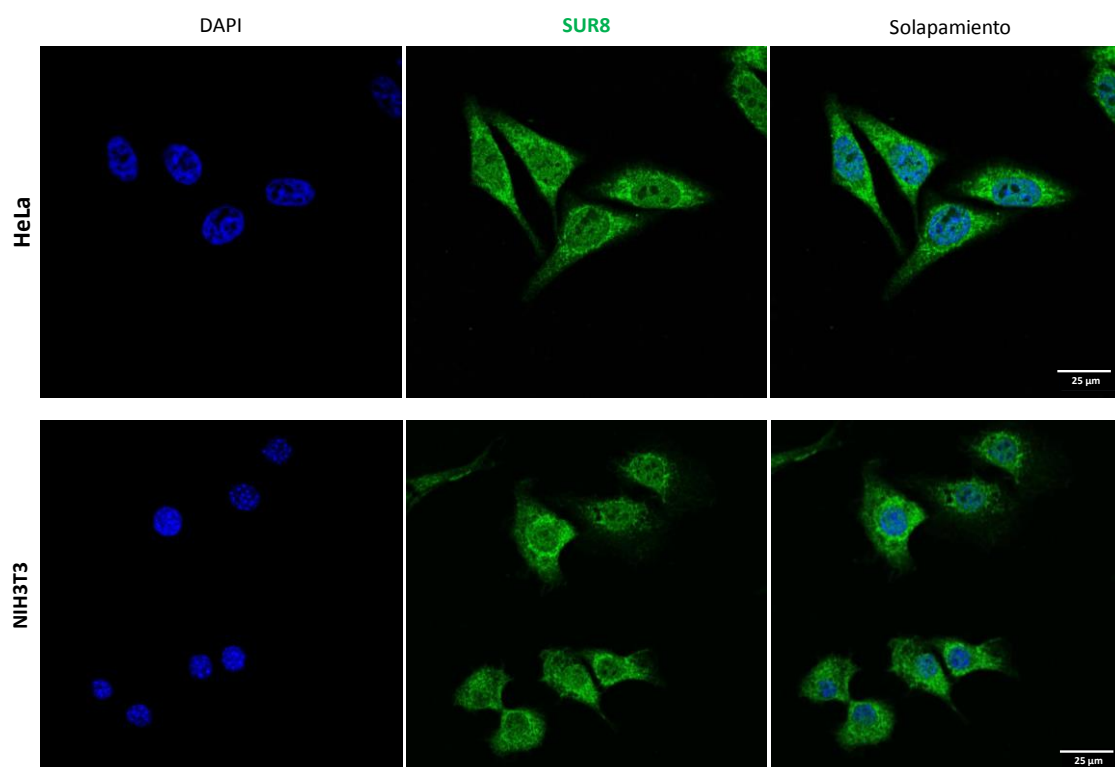


**FIGURA R-11. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE SUR8 EN MICRODOMINIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA TRAS ESTIMULACIÓN CON FGF.** Separación en gradientes de sacarosa de extractos de células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pEF1-Sur8 S2G-MYC o pCEFL-KZ-AU5-MYR-Sur8 y que se privaron de suero durante 16h antes de su estimulación con FGF (50 ng/ml, 10 min). LT: Lisado total. El análisis por WB se realizó usando, como anticuerpos primarios, α-AU5 para detectar Sur8 wt y MYR-Sur8 o α-MYC para la detección de Sur8 S2G, y α-Transferrina y α-Caveolina como controles de los distintos microdominios de membrana. Este experimento se realizó tres veces con similares resultados.

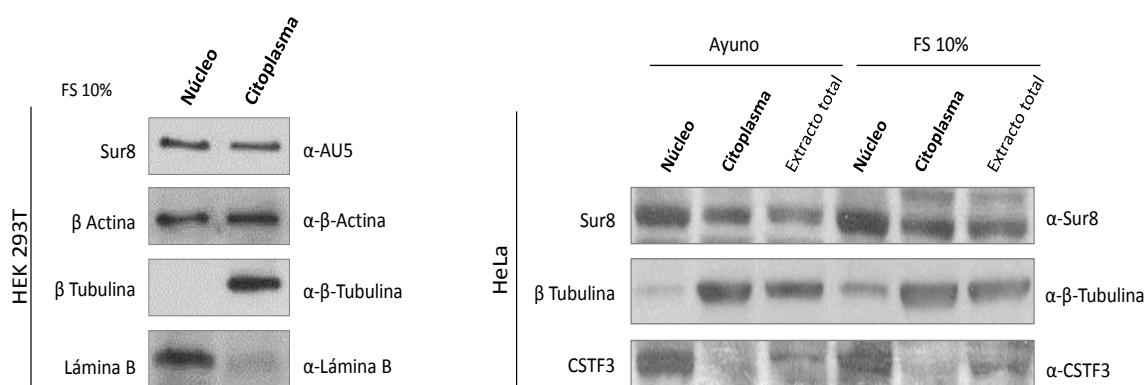
### 2.3 LOCALIZACIÓN DE SUR8 EN EL NÚCLEO CELULAR

Resultados anteriores del laboratorio, muestran que en células UR61 (derivadas de PC12) la distribución celular de Sur8 se encuentra, principalmente, en citoplasma y en el área perinuclear. Asimismo, Sur8 aparece en el núcleo de células diferenciadas o que inician diferenciación, estando excluido del nucléolo (León, 2010). Estas observaciones, en la misma línea que otros trabajos (Cordeddu *et al.*, 2009; Jeoung *et al.*, 2013), nos llevaron a estudiar la presencia de Sur8 en este orgánulo celular.

Como primera aproximación, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para comprobar la distribución de la proteína Sur8 endógena, utilizando células HeLa y células NIH3T3. En la Figura R-12 se muestra como, para ambos tipos celulares en condiciones de crecimiento normal, Sur8 se localiza en el núcleo, la región perinuclear y en el citoplasma. Resultados similares se obtuvieron tras la transfección ectópica de Sur8 en células HeLa (Anexo 3). Mediante un ensayo bioquímico de separación de núcleo y citoplasma en células HEK 293T sobreexpresando Sur8 y HeLa, se observa como esta proteína también aparece en ambas fracciones (Fig. R-13).



**FIGURA R-12. DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE SUR8.** Inmunofluorescencia de células HeLa y células NIH3T3 en condiciones de crecimiento normal con FS 10% y CS 10%, respectivamente. Como anticuerpo primario para la detección de Sur8 se empleó  $\alpha$ -Sur8 y, como secundario,  $\alpha$ -conejo FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI.



**FIGURA R-13. DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE SUR8.** (Izquierda) WB de la separación núcleo/citoplasma de células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt y crecidas en FS 10%. La detección de Sur8 se realizó con un anticuerpo contra su epítipo, α-AU5. El resto de proteínas se detectaron empleando anticuerpos específicos: α-βactina, como control de carga, y α-β tubulina y α-lámina B, como marcadores de citoplasma y núcleo, respectivamente; (derecha) WB de la separación núcleo/citoplasma de células HeLa crecidas en condiciones de ayuno o de FS 10%. La detección del Sur8 endógeno se realizó con anticuerpo α-Sur8. Se empleó α-β tubulina como marcador de citoplasma y como marcador de núcleo se utilizó α-CSTF3, factor que participa en la maduración de los pre-mRNAs.

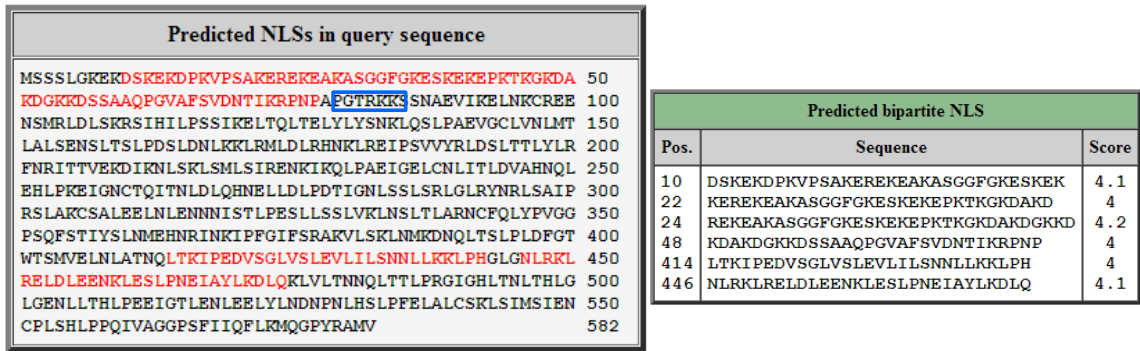
### 2.3.1 Búsqueda de secuencias NLS y NES en Sur8

Ante estos resultados, procedimos al estudio de la estructura primaria de Sur8 con el objetivo de encontrar posibles señales de localización nuclear (NLS) y/o de exportación (NES).

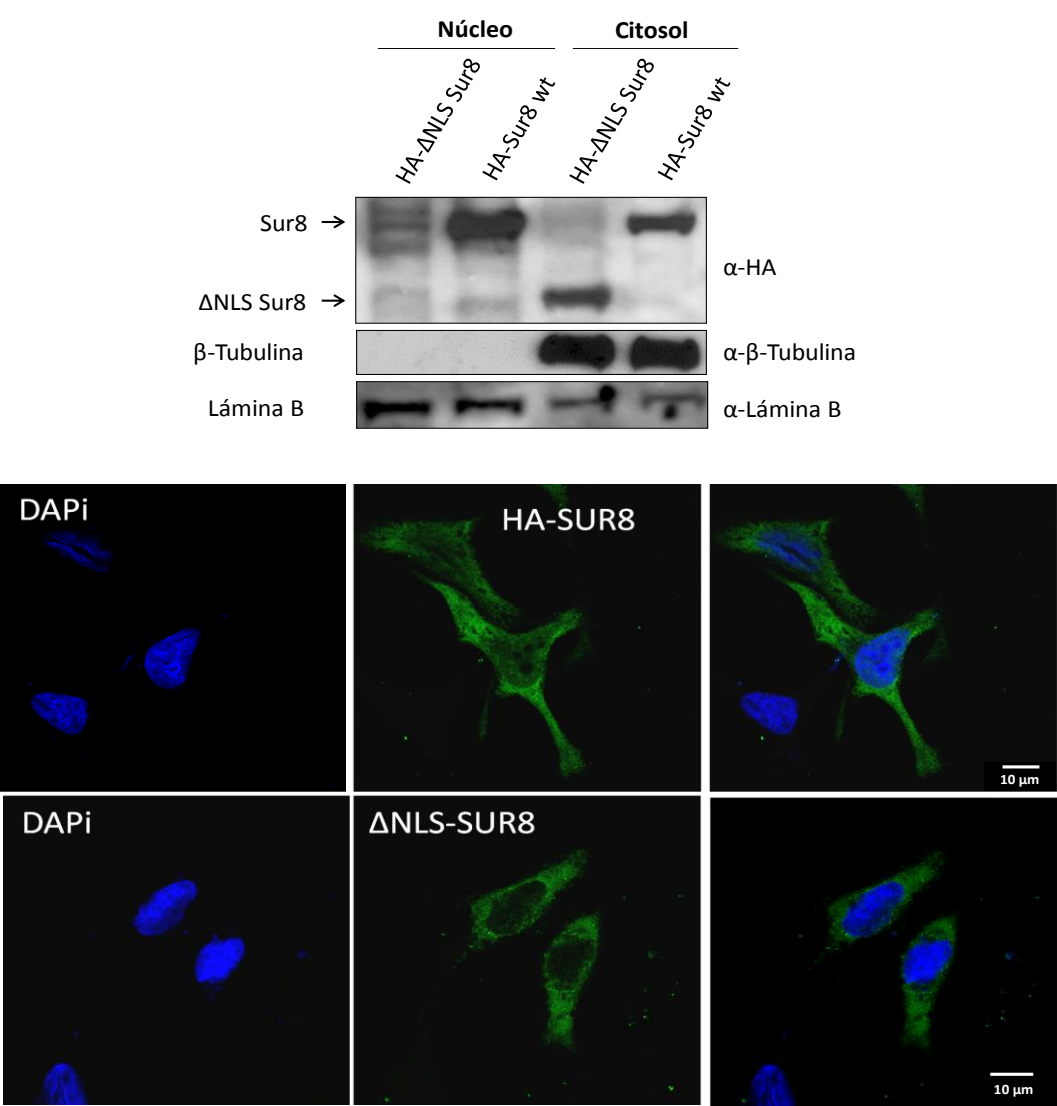
Las proteínas que deben ser translocadas desde el citoplasma al núcleo para realizar determinadas funciones, contienen cortas secuencias de aminoácidos conocidas como NLS que son reconocidas por importinas αβ. Tras el análisis *in silico*, detectamos la secuencia PGTRKKS en posición 79 como NLS similar a la consenso del antígeno T SV40 (programa *PSORT II*) y varias señales bipartitas en el extremo N-terminal y C-terminal (programa *NLS-mapper*) (Fig. R-14A). Para validar estos análisis, generamos un mutante de delección de Sur8 en el extremo N-terminal sin los primeros 88 residuos (ΔNLS Sur8), incluyendo algunas de las putativas NLS, y comprobamos la localización de la proteína truncada mediante ensayos de separación núcleo/citoplasma. Como se muestra en la Figura R-14B, la proteína ΔNLS Sur8 solo se detecta en la fracción citosólica, mientras que Sur8 wt aparece tanto en citosol como en núcleo. Realizamos ensayos de inmunofluorescencia empleando esta proteína truncada y el resultado mostró que ΔNLS Sur8 queda acumulada en citosol, mientras que la forma wt sobreexpresada se puede visualizar tanto en citosol como en el núcleo de células HeLa (Fig. R-14B).

A

cNLS Mapper Result



B



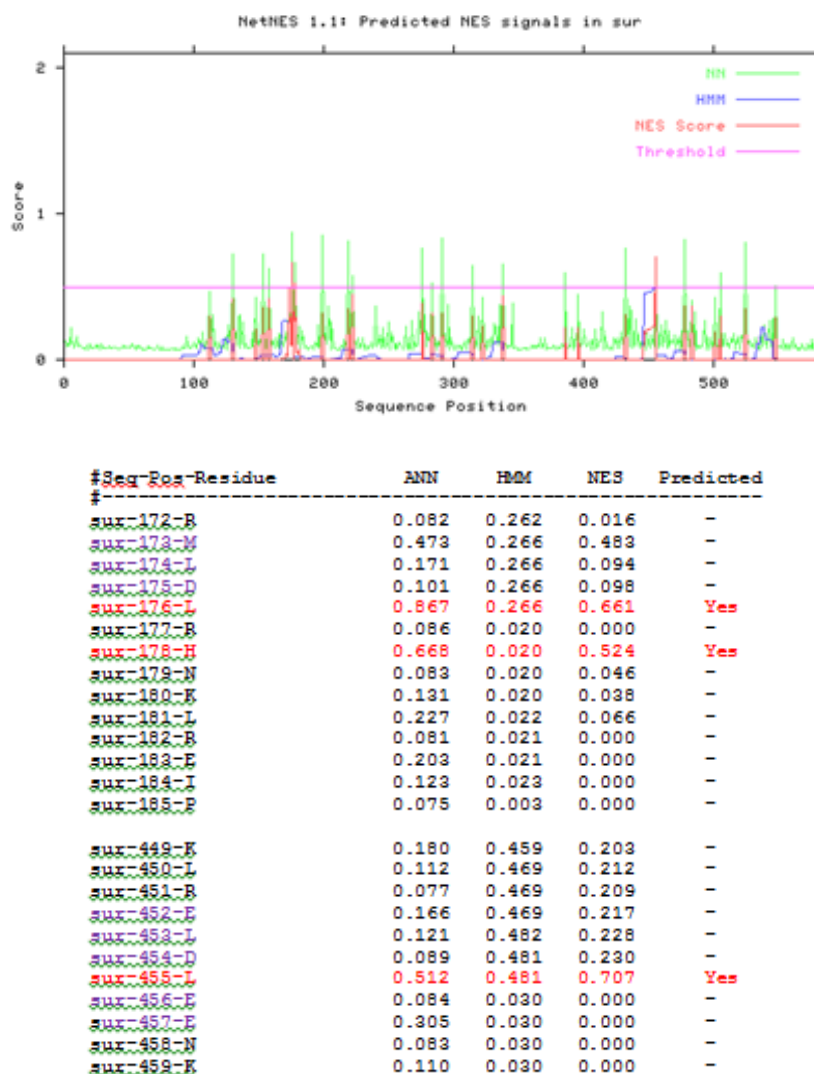
DAPI

HA-SUR8

ΔNLS-SUR8

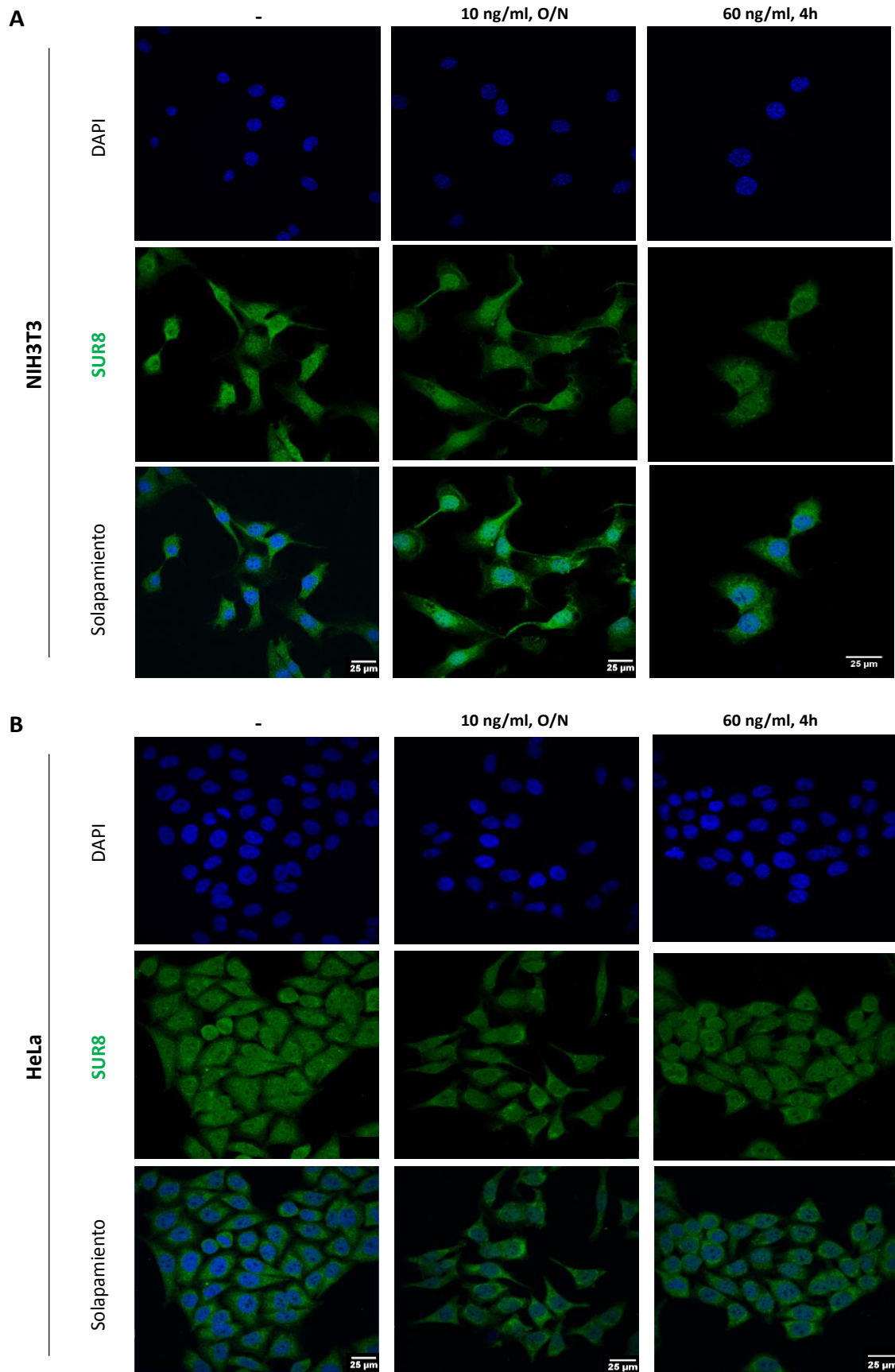
FIGURA R-14. ESTUDIO DE POSIBLES SECUENCIAS NLS EN SUR8. (A) Predicción *in silico*, a través del programa *NLS-mapper*, de posibles NLS bipartitas en Sur8 (en color rojo). La secuencia monopartita predicha por el programa *PSORT II* se indica en el recuadro azul; (B) WB del ensayo de separación núcleo/citoplasma realizado en células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt o pCEFL-KZ-HA-Sur8 ΔNLS. Se empleó α-HA para detectar ambas construcciones y, como controles del ensayo, α-β tubulina (marcador de citoplasma) y α-lámina B (marcador de núcleo). En el panel inferior, se muestran imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt o el mutante de delección (ΔNLS Sur8), mantenidas en cultivo con FS 10%. Se empleó α-HA, seguido de α-ratón FITC, para detectar ambas construcciones y DAPI para la tinción de los núcleos.

También evaluamos la posibilidad de que Sur8 sea capaz de salir del núcleo ante determinados requerimientos celulares. Para ello, es necesario el reconocimiento de NES por exportinas como CRM1. En la estructura primaria de Sur8, se identificaron varias regiones entre los aminoácidos 173-181 y 450-457, con 4-5 residuos hidrofóbicos característicos de las secuencias NES, predominantemente leucinas (*NetNES 1.1*) (Fig. R-15).



**FIGURA R-15. ESTUDIO *IN SILICO* DE SECUENCIAS NES EN SUR8.** Predicción *in silico* de posibles secuencias NES en Sur8 mediante el programa *NetNES 1.1*.

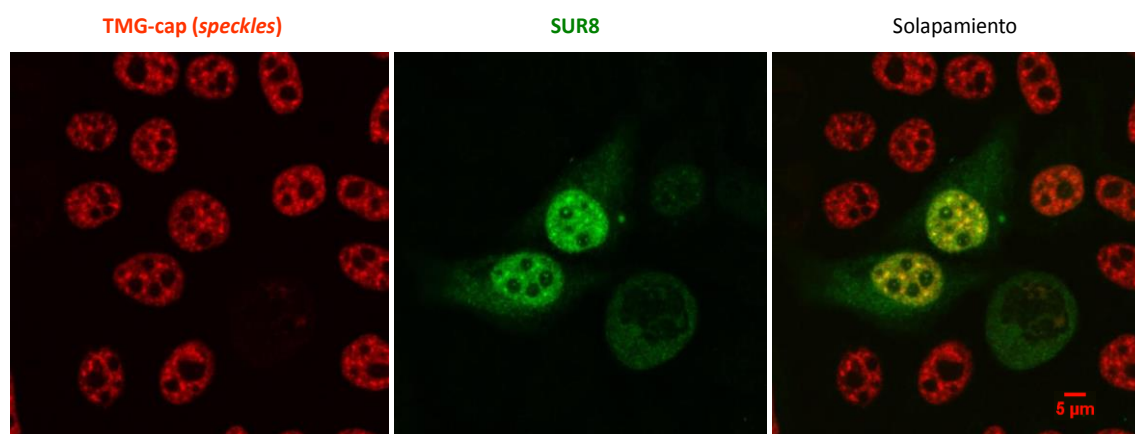
Tras los experimentos realizados en HeLa y NIH3T3 con Leptomicina B, inhibidor de CRM1, Sur8 parece acumularse ligeramente en núcleo y en la región perinuclear en ambos tipos celulares (Fig. R-16); mientras, p65, miembro de la familia de NF- $\kappa$ B empleada como control, se acumula enteramente en el núcleo (Anexo 4), sugiriendo que Sur8 podría estar implicada en el transporte entre el núcleo-citoplasma o verse regulada por otras exportinas.



**FIGURA R-16. ESTUDIO DE LA EXPORTACIÓN DE SUR8 DESDE EL NÚCLEO CELULAR.** Células NIH3T3 (A) y HeLa (B) mantenidas en condiciones normales de cultivo, fueron tratadas con o sin Leptomycin B a diferentes concentraciones (10 ng/ml o 60 ng/ml) y tiempos (4h-O/N). Se usó  $\alpha$ -Sur8 como anticuerpo primario, seguido de  $\alpha$ -conejo FITC, para visualizar la localización de Sur8. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

### 2.3.2 Localización de Sur8 en los *speckles* nucleares

Los *speckles* son pequeñas estructuras nucleares sin membrana, también llamadas compartimentos de factores de *splicing* o *clusters* de gránulos intercromatínicos. Se trata de estructuras dinámicas que sirven como reservorio de factores que participan en la transcripción mediada por la RNA polimerasa II y en el procesado del pre-mRNA, por lo que dependen del estado transcripcional de la célula (Lamond and Spector, 2003). En la Figura R-17, se muestra como Sur8 sobreexpresado en células HeLa, se encuentra en la misma localización que el marcador de *speckles* TMG-cap, sugiriendo que Sur8 podría estar implicado en la acumulación de determinados factores en los *speckles* o actuar como factor necesario para la transcripción o el *splicing* del pre-mRNA. Podemos destacar que es frecuente que las células con altos niveles de expresión de Sur8, muestren *speckles* menos densos, sugiriendo que estas células son más activas transcripcionalmente.



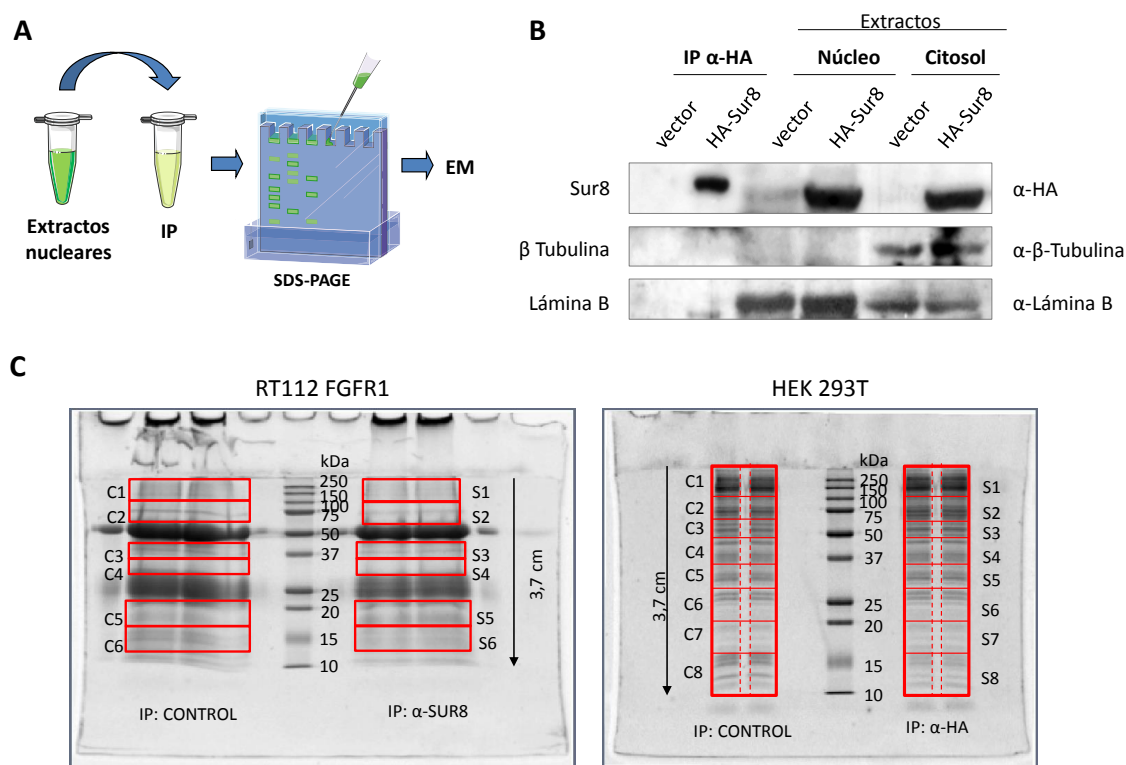
**FIGURA R-17. SUR8 COLOCALIZA CON LOS *SPECKLES* EN EL NÚCLEO CELULAR.** Imágenes de inmunofluorescencias dobles en células HeLa, crecidas en FS al 10%, después de 24h desde la transfección de pCEFLZ-HA-Sur8 wt. Sur8 se ha visualizado empleando  $\alpha$ -HA como anticuerpo primario y  $\alpha$ -ratón FITC como secundario. Los *speckles* se han detectado con  $\alpha$ -TMG-CAP seguido de  $\alpha$ -conejo Texas Red. Las áreas de colocalización en el solapamiento aparecen en color amarillo.

## 2.4 SUR8 PODRÍA DESEMPEÑAR DIVERSAS FUNCIONES EN EL NÚCLEO CELULAR

Paralelamente a los ensayos de inmunofluorescencia y en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio Casal (CIB), realizamos una aproximación proteómica analizando las proteínas con las que Sur8 estaría interaccionando en el núcleo celular. Para ello, empleamos un subtipo celular derivado de una línea de cáncer de vejiga con el FGFR1 sobreexpresado (RT112-FGFR1), con gran cantidad de Sur8 (Anexo 5). A partir de los extractos nucleares de esta línea celular se inmunoprecipitó la proteína Sur8 endógena. En paralelo, sobreexpresamos HA-Sur8 ectópicamente en células HEK 293T y se inmunoprecipitó Sur8 de los extractos nucleares, empleando el anticuerpo  $\alpha$ -HA. De ambos inmunoprecipitados se realizó un estudio



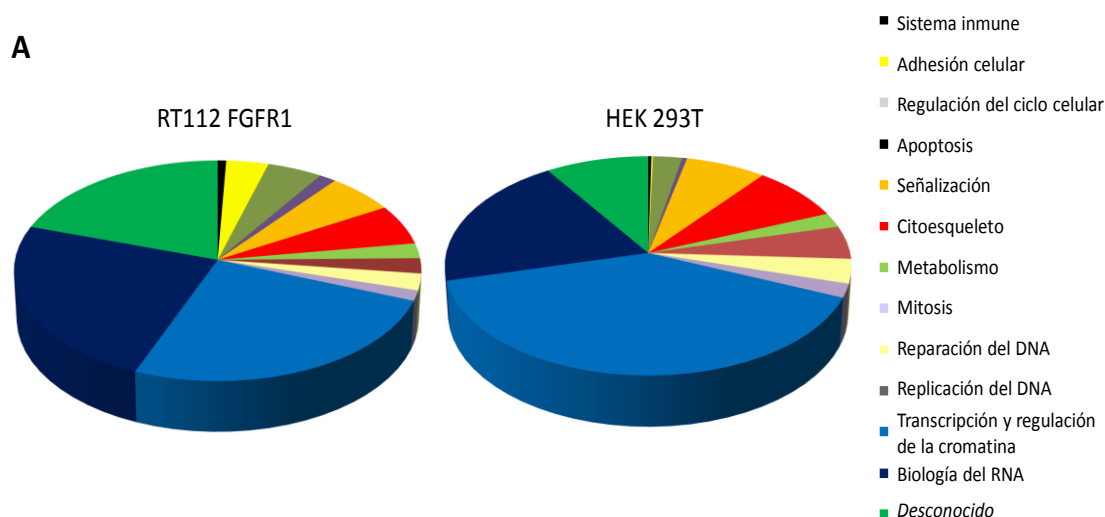
proteómico para detectar las proteínas nucleares que coimmunoprecipitan con Sur8, siendo caracterizadas por espectrometría de masas (EM). En la Figura R-18 y en el apartado de Materiales y Métodos 10.4, se describen los pasos realizados tras la obtención de los inmunoprecipitados.



**FIGURA R-18. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE INTERACCIONES DE SUR8 EN EL NÚCLEO CELULAR.** (A) Esquema de los pasos realizados hasta llegar al análisis de las proteínas que interaccionan con Sur8. EM: Espectrometría de masas; (B) WB de la IP con α-HA de células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt, de las que se analizó el inmunoprecipitado nuclear; (C) Geles de acrilamida obtenidos de las muestras inmunoprecipitadas en RT112-FGFR1 con α-Sur8 (izquierda) y HEK 293T con α-HA (derecha). En el caso del gel α-HA (derecha) se aislaron 2 bandas extra, que corresponden a las zonas de movilidad de la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas en el gel de las RT112-FGFR1.

Los resultados obtenidos por EM con cada una de las aproximaciones, mostraron que la mayoría de las proteínas detectadas están relacionadas con la transcripción y regulación de la cromatina, así como con la biología del RNA (Fig. R-19A). Aunque se trata de tipos celulares muy distintos y se han realizado aproximaciones diferentes, hemos detectado una serie de proteínas comunes en ambos tipos celulares (Fig. R-19B). La lista completa de las proteínas obtenidas se muestra en los Anexos 6 y 7.





**B**

PROTEÍNA	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
SPATS2-like protein [Q9NUQ6]	<i>Desconocida</i> pero parece implicada en la respuesta a estrés oxidativo	Núcleo / Citoplasma
General transcription factor 3C polypeptide 2, TF3C2 [Q8WUA4]	Implicada en la iniciación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa III	Núcleo
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 [P14618]	Enzima glicolítica que participa en la formación de ATP	Núcleo / Citoplasma
DAZ-associated protein 1 [Q96EP5]	Proteína de unión al RNA	Núcleo / Citoplasma
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8, EPS8 [Q12929]	Participa en la transducción de señales de Ras a Rac y controla varias protusiones celulares regulando el citoesqueleto de actina	Citoplasma
Protein BAT2-like 2, BA2L2 [Q9Y520]	<i>Desconocida</i>	<i>Desconocida</i>
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 [O43395]	Participa en el <i>splicing</i> del pre-mRNA formando parte del espliceosoma	Núcleo
Isoform 3 of Cyclin-K, CCNK [O75909]	Participa en el ciclo celular regulando las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). También regula la transcripción a través de la RNA polimerasa II	Núcleo / Citoplasma
Negative elongation factor B, NELFB [Q8WX92]	Componente del complejo NELF, regulador negativo de la transcripción por la RNA polimerasa II	Núcleo

**FIGURA R-19. PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON SUR8 EN EL NÚCLEO CELULAR.** (A) Gráfico en el que se muestran las diferentes funciones de las proteínas obtenidas inmunoprecipitando Sur8 endógeno en células RT112 FGFR1 (izquierda) y Sur8 sobreexpresado en HEK 293T (derecha); (B) Tabla con las proteínas comunes que inmunoprecipitan con Sur8 en ambos tipos celulares, funciones y localizaciones con las que se relacionan.

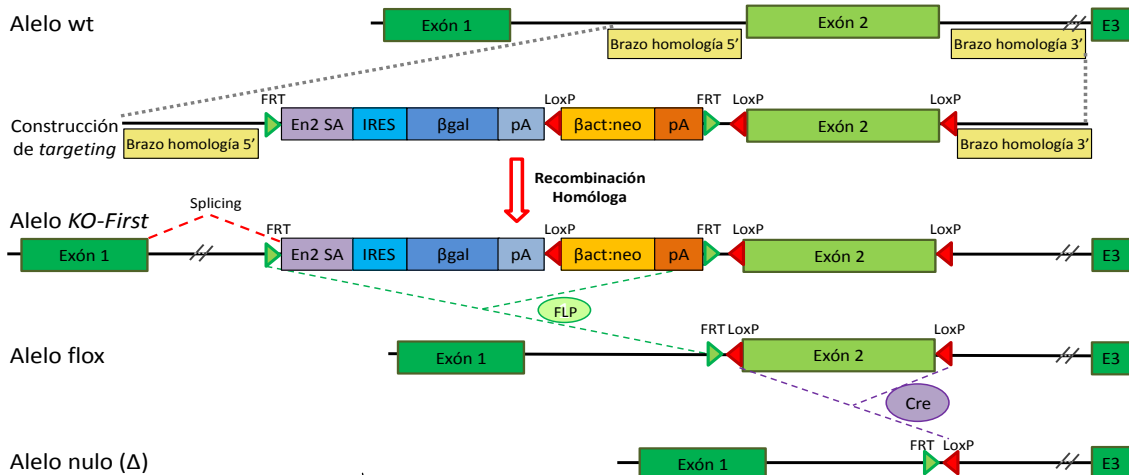
### 3. OBTENCIÓN DEL RATÓN KO CONDICIONAL PARA SUR8 Y SUS LÍNEAS DERIVADAS

Para estudiar la importancia del papel que Sur8 ejerce sobre el control de la vía de activación de ERK *in vivo*, durante esta tesis doctoral, se comenzó a desarrollar en el laboratorio una nueva línea de investigación con ratones modificados genéticamente. Mediante esta aproximación, valoramos la relevancia de esta proteína adaptadora estudiando los efectos derivados de su supresión en tejidos concretos y en el conjunto del animal adulto.

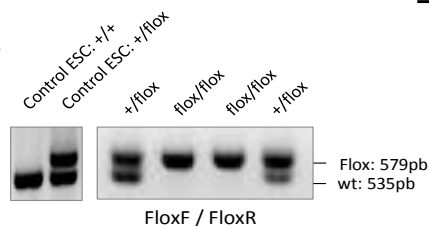
Debido a la letalidad embrionaria que presentan los ratones KO para *Sur8* (Yi *et al.*, 2010), recurrimos a la generación del animal KO condicional. De forma comercial, se encontraban disponibles en el KOMP, ESCs de ratón que contenían en heterocigosis una construcción de tipo *KO-First*, introducida por recombinación homóloga entre los exones 1 y 2 del locus de *Sur8* en el cromosoma 19. Este alelo no se expresa debido a la presencia de un nuevo sitio aceptor de *splicing* que rompe la pauta de lectura del resto del gen. Sin embargo, esta construcción tiene la capacidad de convertirse en un alelo condicional vía recombinación por la enzima FLP que reconoce secuencias FRT, eliminándose así el sitio aceptor de *splicing* junto al gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa y el gen de resistencia a NEO. Tras esta delección, solo quedará el exón 2 flanqueado por sitios LoxP. El gen *Sur8* murino posee 9 exones que codifican para una proteína de 581 aminoácidos, pero es el exón 2 el que contiene la mayor parte de pauta de lectura, por lo que su eliminación producirá la supresión de un producto génico funcional (Fig. R-20A).

## A

### Alelos *Sur8*



## B



**FIGURA R-20. ESTRATEGIA DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y OBTENCIÓN DEL ALELO KO CONDICIONAL DE *SUR8*.** (A) Representación esquemática de los alelos derivados de este estudio. El vector de recombinación homóloga ("construcción de *targeting*") contiene una señal aceptora de *splicing* ("En2 SA", violeta), el gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa bajo una secuencia IRES y una secuencia de poliadenilación ("pA") (azul) y una caja  $\beta$ -actina-neo-pA (resistencia a NEO) (naranja). Todos estos elementos, flanqueados por secuencias FRT (triángulos verdes). Seguidamente, encontramos el exón 2 de *Sur8* flanqueado por dos sitios loxP (triángulos rojos). El "alelo *KO-First*" se generó por recombinación homóloga en el locus wt de *Sur8*. Después del corte mediado por la recombinasa FLP, se escindieron todos los elementos englobados entre los sitios FRT, generándose un alelo KO condicional ("alelo flox"). El exón 2 será delecionado mediante acción de la recombinasa Cre, por reconocimiento de las secuencias LoxP, dando lugar al "alelo nulo" para *Sur8*. La posición relativa de los oligonucleótidos utilizados como cebadores (mShoc2F, FloxF, FloxR) en las reacciones de PCR se muestra en el esquema; (B) Imagen de una PCR de genotipado representativa de animales con distintos genotipos, junto con la línea celular ESC parental que se utilizó como control positivo. Los tamaños de los productos de amplificación, derivados del alelo wt y el floxeado, se indican también.

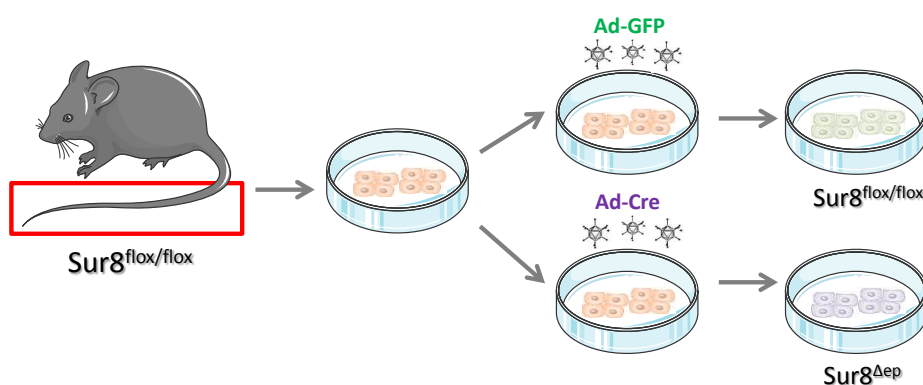
Para generar las quimeras a partir de las ESCs *KO-First*, se contó con la colaboración de la Dra. Sagrario Ortega (CNIO). Las ESCs con el alelo modificado se inyectaron en blastocistos y, una vez introducidos en hembras pseudogestantes, dieron lugar a una serie de animales quiméricos por poseer células de naturaleza genética diferente (apartado 6 de Materiales y Métodos). La expresión del color agouti, restaurado en el genoma de las ESCs modificadas, nos indicó la contribución de estas células en los ratones quimera. Cuando las quimeras se cruzaron con animales C57BL/6 wt, observamos que solo un ratón quimera era capaz de transmitir, por vía germinal, el genoma de las ESCs modificadas, tal como mostró la presencia de crías agouti en su progenie. Sin embargo, ningún ratón en toda la descendencia (más de 100 crías) heredó el alelo *KO-First*, analizando las camadas por PCR a partir de DNA genómico extraído de la cola. La alta expresión de Sur8 en ovario y en distintos estadios de desarrollo (*EST profile*, UniGene, NCBI), junto a este resultado, plantea la posibilidad de que la falta de Sur8, incluso en heterocigosis, podría ser esencial para la generación de los gametos o en alguna fase del desarrollo prenatal.

Para poder llegar a obtener el ratón KO condicional para Sur8, cruzamos estas quimeras con ratones que expresaban la recombinasa FLP, con el fin de convertir el alelo *KO-First* en un alelo KO condicional clásico. La eliminación por recombinación de la región contenida entre los sitios FRT, dio lugar a un alelo flox en el que solo el exón 2 crítico queda flanqueado por los sitios LoxP, expresándose Sur8 de forma normal (Fig. R-20A). Los resultados fueron positivos ya que 1 de cada 8 crías de la progenie del animal quimera que transmitía el color agouti, recibieron el alelo flox (Fig. R-20B). Para obtener los animales homocigotos para este alelo, los animales Sur8<sup>flox/+</sup> de la F1 fueron cruzados entre sí, obteniendo animales Sur8<sup>flox/flox</sup> en fondo genético C57BL/6, con la segregación mendeliana esperada, normales fenotípicamente y fértiles. Una vez tuvimos la colonia establecida, cruzamos estos ratones con las cepas transgénicas K5-Cre<sup>T/+</sup> y UbiquitinaC (UBC)-Cre<sup>ERT2 T/+</sup> inducible por tamoxifeno, para estudiar los efectos de la delección de Sur8 en piel y las consecuencias de su eliminación global tras el destete de los animales, respectivamente.

## 4. PAPEL DE SUR8 EN EL DESARROLLO Y FISIOLÓGÍA DE LA EPIDERMIS DE RATÓN

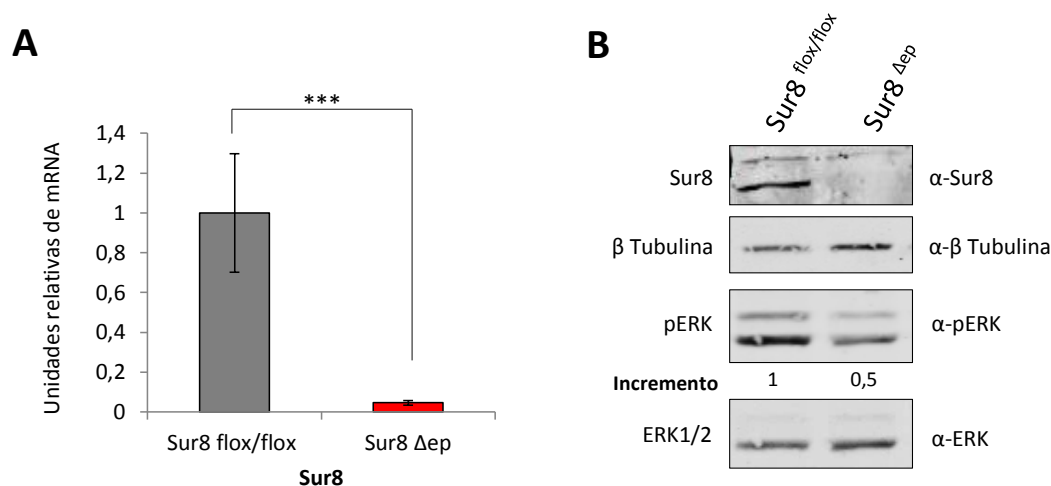
4.1 ANÁLISIS DE LA ELIMINACIÓN DE SUR8 EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS DERIVADOS DEL RATÓN  
KO CONDICIONAL SUR8<sup>FLOX/FLOX</sup>

Para abordar el estudio del papel de Sur8 en la epidermis, comenzamos por una aproximación *ex vivo* mediante la obtención de cultivos primarios de queratinocitos aislados a partir de la cola de ratones adultos de la línea Sur8<sup>flox/flox</sup> establecida. Una vez en cultivo, los queratinocitos primarios fueron infectados con adenovirus que expresan la recombinasa Cre (o la proteína GFP como control) para provocar la escisión de los alelos floxeados de *Sur8* (Fig. R-21). Una vez eliminada su expresión, analizamos cambios en la expresión génica de diferentes marcadores relacionados con proliferación, diferenciación e inflamación epidérmica.



**FIGURA R-21. CULTIVO PRIMARIO E INFECCIÓN DE QUERATINOCITOS DERIVADOS DE ANIMALES KO CONDICIONALES PARA SUR8.** Esquema representando el procedimiento seguido para la obtención de los queratinocitos primarios a partir de la cola de una mezcla de varios animales adultos Sur8<sup>flox/flox</sup>. Las células aisladas y puestas en cultivo fueron infectadas con adenovirus que expresan la recombinasa Cre o GFP, de modo que se obtuvieron células KO para Sur8 y células control procedentes de un mismo cultivo primario.

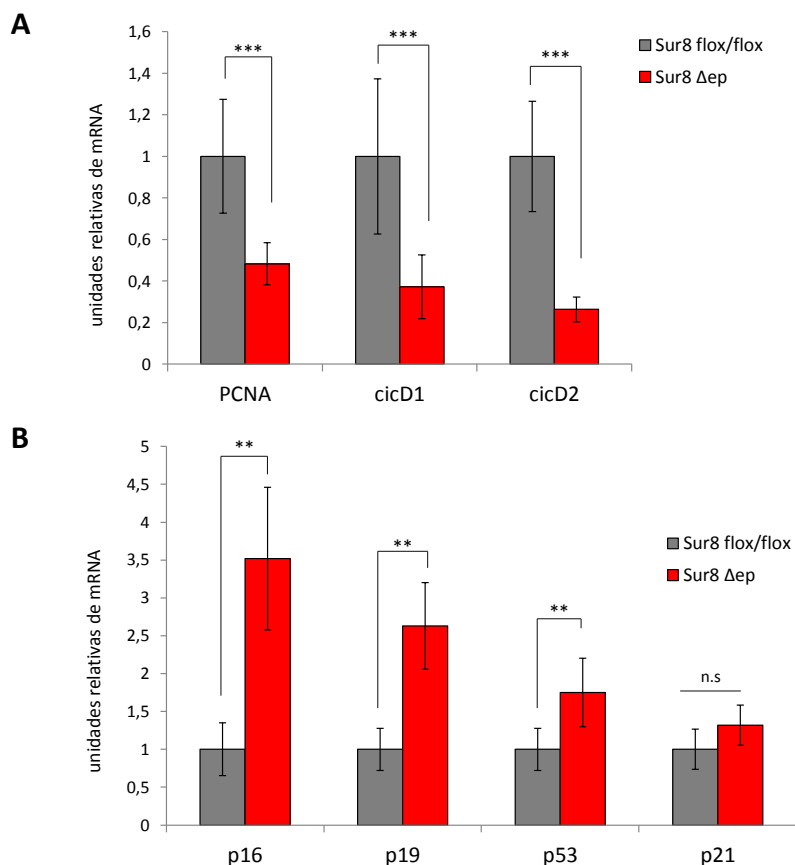
En la Figura R-22A se muestra la disminución significativa de expresión de *Sur8* tras la infección con Adeno-Cre, cuantificada mediante qRT-PCR. Mediante WB se comprobó también la reducción de la proteína Sur8 en estas células, así como la menor fosforilación de ERK en los queratinocitos KO para Sur8 (Sur8<sup>Δep</sup>).



**FIGURA R-22. ANÁLISIS DE LA ELIMINACIÓN DE SUR8 EN QUERATINOCITOS DERIVADOS DE ANIMALES KO CONDICIONALES.** (A) Análisis por qRT-PCR de *Sur8* en queratinocitos procedentes de 3 ratones *Sur8<sup>flox/flox</sup>* de 4-6 meses de edad, 5 días después de su aislamiento e infección con adeno-GFP o Cre. El mRNA fue normalizado con *GAPDH*. La gráfica muestra el resultado de un experimento representativo, realizado por triplicado, de dos experimentos independientes. Las barras muestran la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; (B) Análisis por WB de los lisados celulares de los queratinocitos infectados con adeno-GFP o adeno-Cre usando α-Sur8, α-pERK y α-ERK como anticuerpos primarios. Como control de carga se empleó la expresión de β tubulina. En el WB se muestra el incremento obtenido de la cuantificación de la intensidad de señal de pERK respecto de la señal de ERK total.

#### 4.1.1 Sur8 influye positivamente en la progresión del ciclo celular de queratinocitos *in vitro*

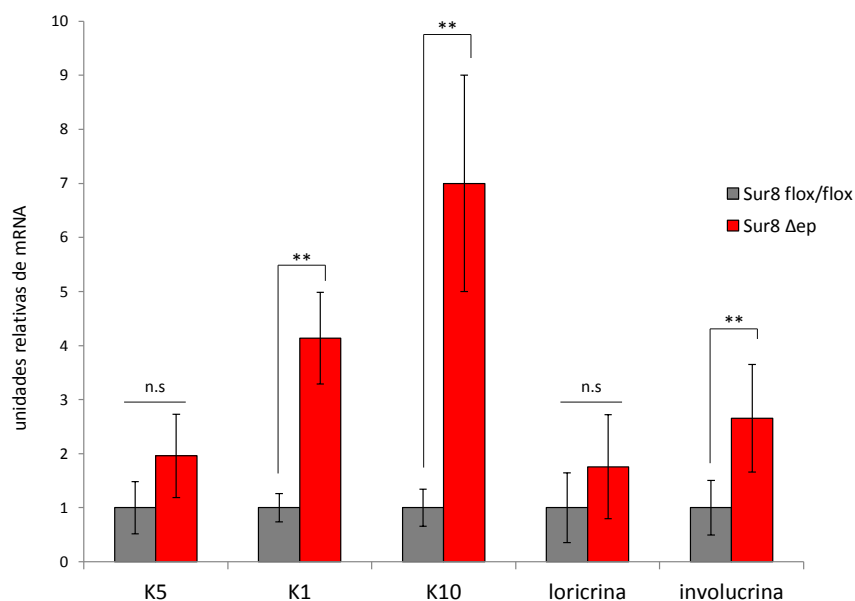
Procedimos al análisis por qRT-PCR de posibles cambios en la expresión de marcadores relacionados con la proliferación celular. Los resultados obtenidos, muestran que en los queratinocitos *Sur8<sup>Δep</sup>*, hay un descenso significativo de *ciclina D1*, *ciclina D2* y del antígeno nuclear asociado a células proliferativas (*PCNA*) (Fig. R-23A). La reducción en la expresión de estos reguladores positivos del ciclo celular, fue acompañada de un aumento en inhibidores tales como *p53*. Además, la expresión de genes inductores de senescencia como *p16* y *p19* aumentó en ausencia de Sur8 (Fig. R-23B). Estos resultados sugieren que Sur8 podría intervenir en la regulación de la proliferación epidérmica, estimulando la progresión del ciclo celular.



**FIGURA R-23. SUR8 INFLUYE POSITIVAMENTE EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DE QUERATINOCITOS *IN VITRO*.** Análisis por qRT-PCR de queratinocitos primarios aislados de 3 ratones adultos KO condicionales para Sur8, 5 días después de su aislamiento e infección con adenovirus Cre (Sur8<sup>Δep</sup>) o GFP (Sur8<sup>flox/flox</sup>). En (A) se representa la expresión de reguladores positivos del ciclo celular (*cicD1*, *cicD2*) y el marcador de proliferación *PCNA*. En (B) se muestra la expresión de reguladores negativos del ciclo (*p16*, *p19*, *p53*, *p21*). La expresión de cada mRNA fue normalizado con *GAPDH*. Se muestran resultados de un experimento representativo, realizado por triplicado, de dos experimentos independientes con similares resultados. Las barras de error representan la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , n.s: no significativo.

#### 4.1.2 La expresión de marcadores de diferenciación en queratinocitos primarios está regulada negativamente por Sur8

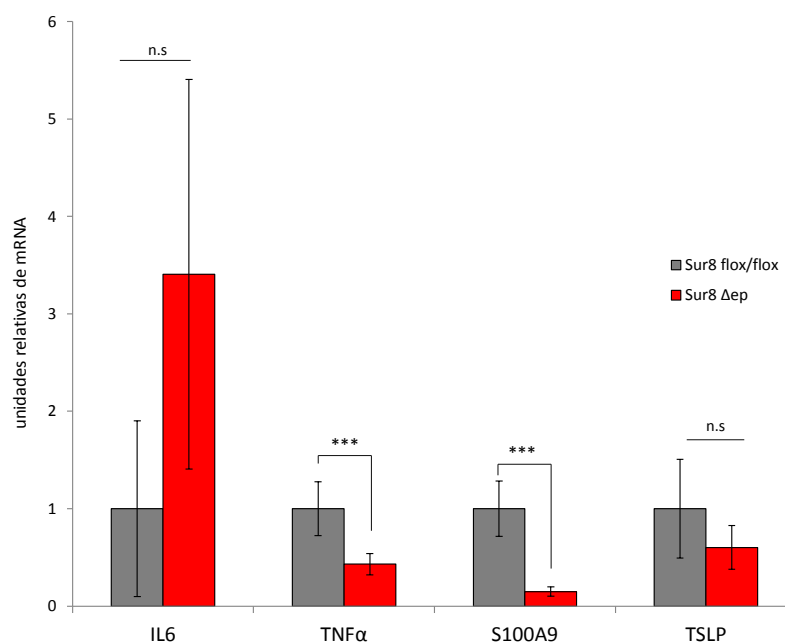
En los queratinocitos aislados, se analizó también si la falta de Sur8 podría afectar a la expresión de genes característicos de la diferenciación epidérmica. En ausencia de Sur8, como se muestra en la Figura R-24, se produce la inducción de la expresión de las queratinas suprabasales *K1* y *K10*, marcadoras de diferenciación temprana, e *Involucrina*, marcador de diferenciación intermedia. Estos efectos, complementarios a los obtenidos con los marcadores de proliferación, sugieren que Sur8 interviene negativamente sobre la diferenciación de queratinocitos *in vitro*. La expresión de *K5*, queratina específica de la capa basal donde se encuentran las células indiferenciadas en proliferación, no se altera significativamente.



**FIGURA R-24. LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS ESTÁ REGULADA NEGATIVAMENTE POR SUR8.** Cuantificación por qRT-PCR de genes característicos de diferenciación epidérmica (*K5*, *K1*, *K10*, *Involucrina* y *Loricrina*) en queratinocitos deficientes en Sur8 ( $\text{Sur8}^{\Delta_{ep}}$ ) y queratinocitos control ( $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$ ), obtenidos de 3 ratones  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$  de 4-6 meses de edad sometidos a la infección con adenovirus-Cre o GFP. La expresión de estos genes se normalizó respecto a *GAPDH*. Se muestran resultados de un experimento representativo, realizado por triplicado, de dos experimentos independientes con resultados similares. Las barras de error representan la desviación estándar. \*\*:  $p < 0.01$ , n.s: no significativo estadísticamente.

#### 4.1.3 Sur8 induce el aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias en queratinocitos *in vitro*

En la epidermis, los queratinocitos son fuente de secreción de citoquinas proinflamatorias y ejercen un papel clave en el desarrollo de diferentes enfermedades epidérmicas. Examinando la expresión de marcadores implicados en inflamación en los queratinocitos  $\text{Sur8}^{\Delta_{ep}}$ , vemos como hay una disminución en la cantidad de mRNA del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), citoquina proinflamatoria muy potente que estimula la liberación de otras citoquinas (Fig. R-25). Factores proinflamatorios como la proteína de unión a calcio *S100A9*, ven también reducida su expresión. Además, la linfopoyetina estromal tímica (*TSLP*) también disminuye su expresión en los queratinocitos  $\text{Sur8}^{\Delta_{ep}}$ , aunque de forma no estadísticamente significativa (Fig. R-25). La disminución de estos mediadores sugiere que Sur8 podría ejercer un papel proinflamatorio en queratinocitos *in vitro*.



**FIGURA R-25. SUR8 INDUCE EL AUMENTO DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN QUERATINOCITOS *IN VITRO*.** Análisis por qRT-PCR de las citoquinas *TNF-α*, *IL-6*, *S100A9* y *TSLP* en queratinocitos primarios aislados de 3 ratones adultos *Sur8<sup>flox/flox</sup>*, 5 días después de su aislamiento e infección con adenovirus-Cre (*Sur8<sup>Δep</sup>*) o GFP (*Sur8<sup>flox/flox</sup>*). La expresión de cada mRNA fue normalizada con *GAPDH*. Se muestran resultados de un experimento representativo, realizado por triplicado, de dos experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ , n.s: no significativo estadísticamente.

#### 4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL RATÓN KO DE SUR8 EN EPIDERMIS

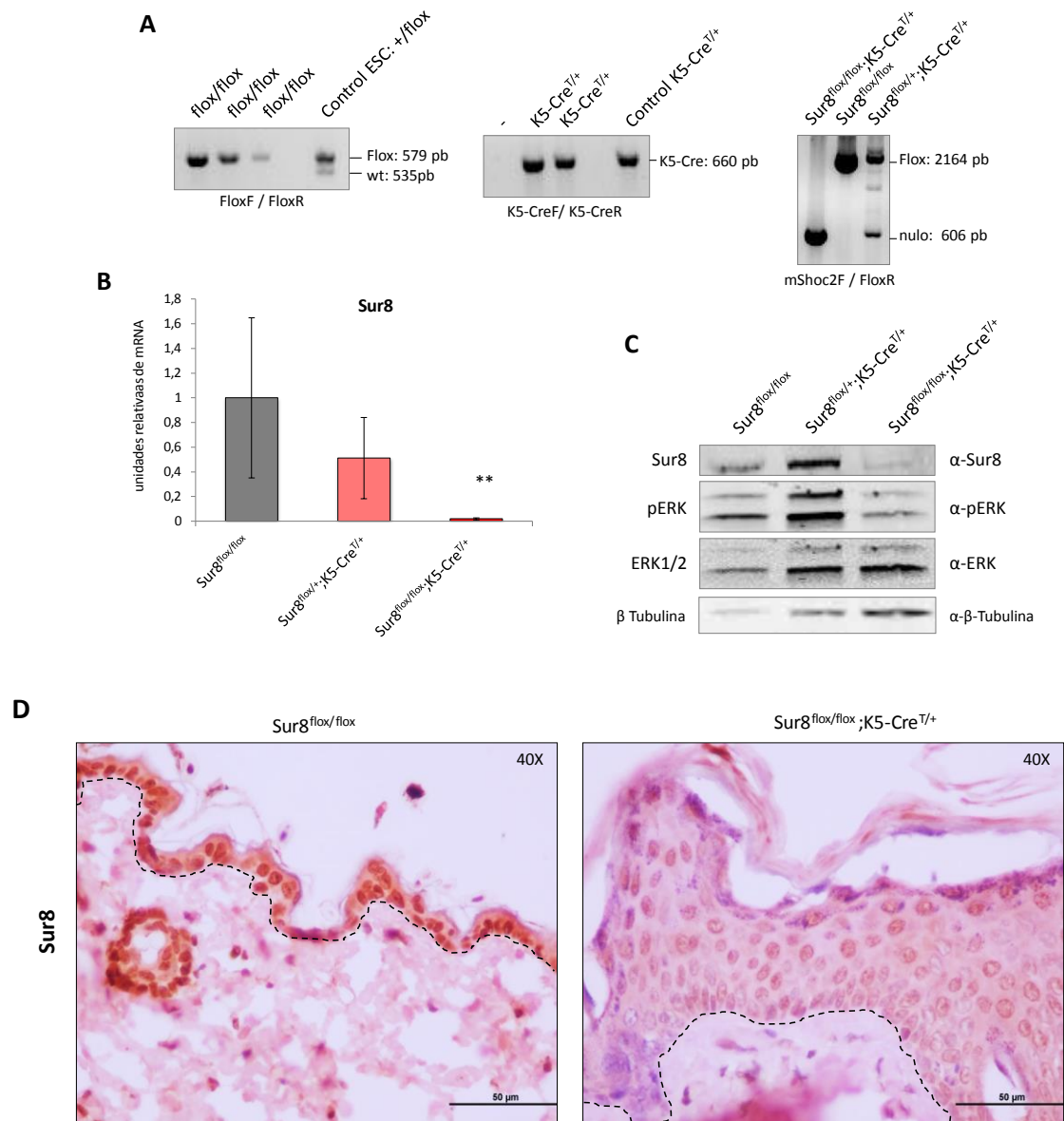
Paralelamente a los estudios *ex vivo* con queratinocitos primarios, dirigimos la eliminación de Sur8 específicamente en epidermis para explorar su papel *in vivo*. Para ello, usamos una línea de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo 14kb del promotor del gen humano de *K5* para dirigir su expresión en la capa basal de la epidermis murina y en la ORS de los folículos pilosos (Tarutani *et al.*, 1997). Para generar estos ratones, los *Sur8<sup>flox/flox</sup>* fueron cruzados con el animal transgénico *K5-Cre<sup>T/+</sup>*, por lo que mediante el sistema Cre-loxP, la eliminación de Sur8 tendrá lugar principalmente en las células troncales que ocupan el compartimento basal de la epidermis y en todas las células del resto de estratos que derivan de ellas, así como en los folículos pilosos.

La progenie heterocigota (*Sur8<sup>flox/+</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>*), con más de 1 año de edad, se ha desarrollado con normalidad y no ha presentado alteraciones ni cambios patológicos aparentes, siendo fenotípicamente comparables a los *Sur8<sup>flox/flox</sup>* (datos no mostrados). El estudio anatómico e histológico de diferentes órganos internos en estos animales (piel,



corazón, hígado, pulmones, cerebro...) no señaló ninguna anormalidad, comparados con los animales control. Al ser fértiles, pudimos realizar los cruces adecuados para obtener los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ . La proporción en la que se obtienen los ratones de diferentes genotipos coincide con una segregación mendeliana, lo que descarta la existencia de letalidad embrionaria en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ . Pese a sus características fenotípicas, que detallaremos seguidamente, los machos  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  han mostrado ser fértiles, mientras que en las hembras parece existir un problema de hipoplasia ovárica que resulta en infertilidad. A lo largo del tiempo, la calidad de vida de estos animales disminuye considerablemente, por lo que suelen ser sacrificados aproximadamente a los 6 meses de edad siguiendo el criterio de punto final.

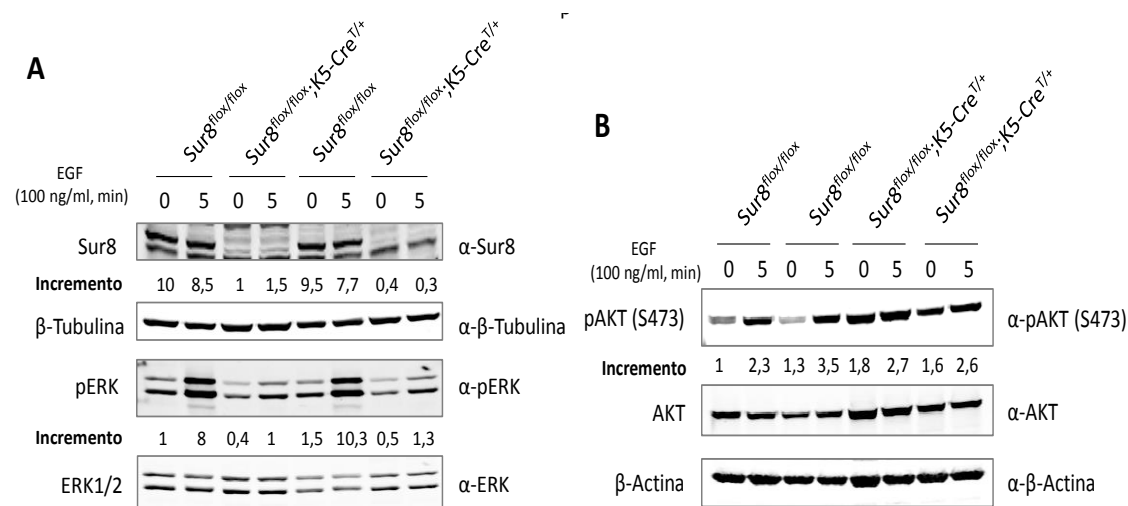
Como se muestra en la Figura R-26A, se comprobó la eliminación del exón 2 de *Sur8* en la epidermis de la descendencia mediante PCR. El análisis por qRT-PCR a partir de RNA total aislado de queratinocitos de la cola de animales de diferentes genotipos, reveló una reducción de la expresión de *Sur8* al 50% en los animales  $Sur8^{flox/+};K5-Cre^{T/+}$  y en más de un 90% en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  (Fig. R-26B). Para comprobar que la delección del exón resulta, finalmente, en la ausencia de un producto génico funcional, extractos de queratinocitos aislados de la cola de estos animales fueron analizados por WB. Como se muestra en la Figura R-26C, la cantidad de proteína *Sur8* en los  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  se redujo significativamente, en comparación con los controles. Asimismo, la fosforilación basal de ERK está reducida ante la falta de *Sur8*, confirmando su papel como regulador positivo de la vía RAS/RAF/MEK/ERK *in vivo*. Por último, como se muestra en la Figura R-26D, la cantidad de proteína *Sur8* detectada por IHQ es marcadamente menor en la epidermis de los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ . Los defectos visibles en la zona de la epidermis de estos animales, se exponen más adelante.



**FIGURA R-26. DELECIÓN DE SUR8 EN LOS ANIMALES SUR8<sup>FLOX/FLOX</sup>;K5-CRE<sup>T/+</sup>.** (A) Análisis por PCR, con los cebadores indicados, del genotipo de distintos animales y de la delección del exón 2 de *Sur8* en ratones de 5 meses de edad, a partir de DNA aislado de queratinocitos de su cola; (B) qRT-PCR de la expresión de *Sur8*, empleando cebadores específicos, a partir de RNA total aislado de queratinocitos de la cola de animales con los genotipos indicados. *GAPDH* se utilizó para normalizar la expresión de *Sur8*. Las barras de error muestran la desviación estándar. \*\*: p<0.01; (C) Detección de α-Sur8, α-pERK y α-ERK por WB en extractos de queratinocitos aislados de la cola de animales Sur8<sup>flox/flox</sup>, Sur8<sup>flox/+</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> y Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>; (D) Análisis por IHQ de la expresión de Sur8 en secciones de piel de animales de diferentes genotipos empleando α-Sur8. Las zonas correspondientes a la epidermis y dermis en ambos animales se encuentran separadas por una línea discontinua. Estos resultados son representativos del análisis de 5 individuos de 5 meses de edad de cada genotipo. Aumento 40X.

Tras los resultados anteriores, estudiamos las consecuencias de la falta de Sur8 tras estimulación con EGF en queratinocitos aislados de los animales KO. Para ello, procedimos al cultivo *ex vivo* de células de la cola de ratones Sur8<sup>flox/flox</sup> y Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. Después de 24h en cultivo, los queratinocitos se mantuvieron una noche en ayuno antes de ser estimulados

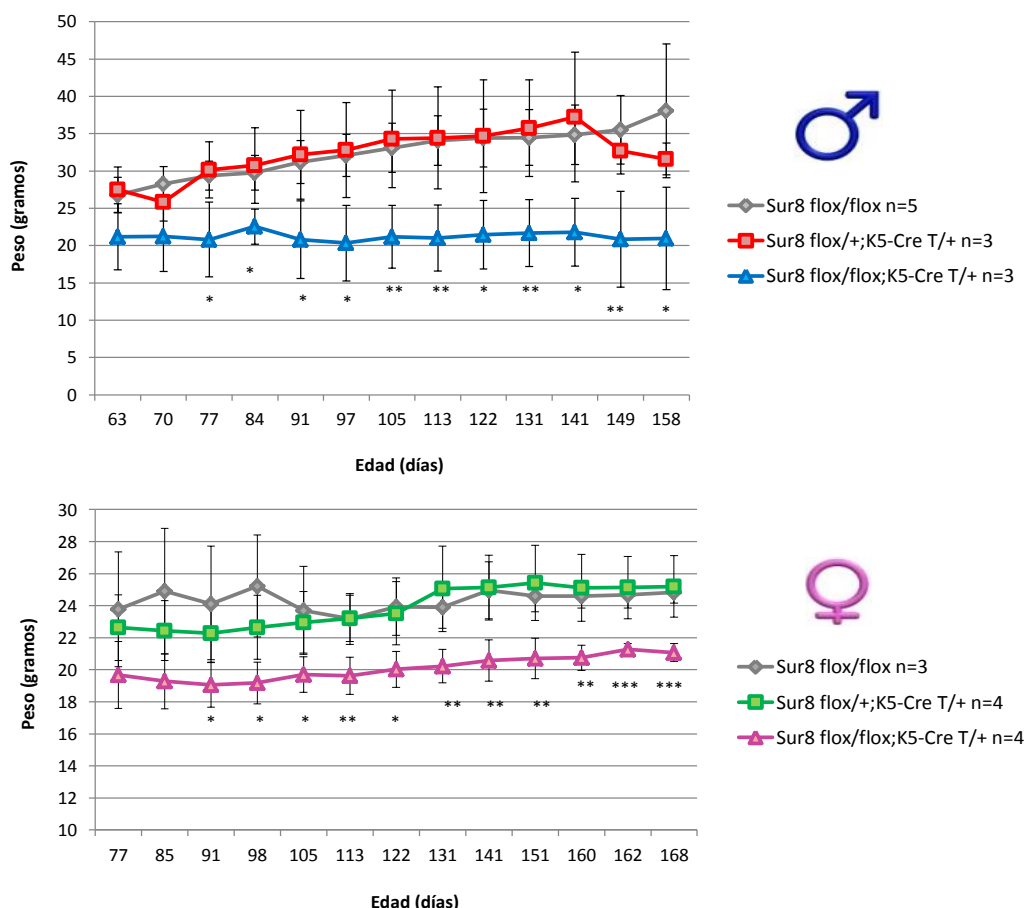
con EGF. En la Figura R-27A, se detecta el descenso de Sur8 junto a una reducción de los niveles de ERK fosforilado tanto en ayuno como tras estimulación. Además, en estas mismas condiciones se detecta un aumento de los niveles basales de pAKT en los queratinocitos deficientes en Sur8. Estos resultados sugieren que la falta de Sur8 regula positivamente la fosforilación basal de AKT (Fig. R-27B).



**FIGURA R-27. INFLUENCIA DE LA DELECCIÓN DE SUR8 EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR EGF EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS.** Análisis por WB de lisados procedentes de queratinocitos primarios de la cola de animales de 2 meses de edad Sur8<sup>flox/flox</sup> y Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. Se muestran resultados de dos ratones diferentes de cada genotipo. Las células fueron aisladas, cultivadas *in vitro* y estimuladas tras 16h de ayuno con 100 ng/ml de EGF en los tiempos indicados. (A) La detección de Sur8, β tubulina, pERK y ERK total se realizó con anticuerpos específicos α-Sur8, α-βtubulina, α-pERK y α-ERK. Los “incrementos” muestran el ratio Sur8/tubulina o pERK/ERK, obtenidos de la cuantificación de la intensidad de cada señal en cada punto; (B) La presencia de AKT fosforilado en la S473 y AKT total se detectó mediante anticuerpos específicos α-AKT (S473) y α-AKT, respectivamente. Los niveles de βactina se emplearon como control de carga. En el WB se muestra el “incremento” obtenido de la cuantificación de la intensidad de señal de pAKT, respecto a la intensidad de la señal de AKT total en cada punto.

#### 4.2.1 Los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> son de menor tamaño

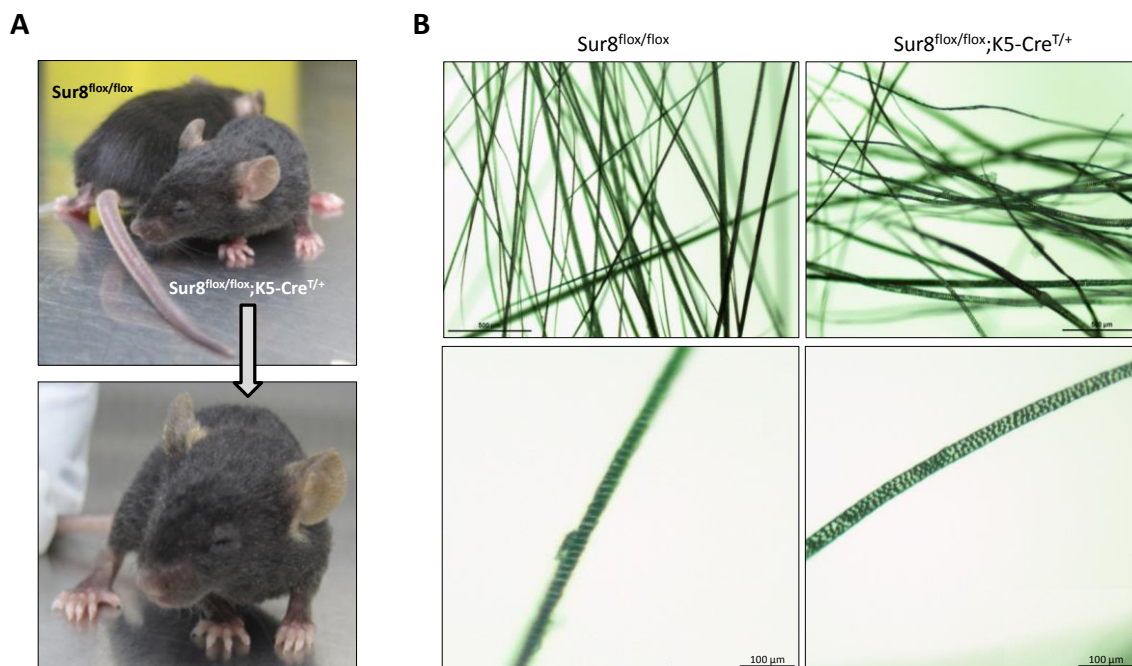
La delección de los dos alelos de Sur8 específicamente en el estrato basal de la epidermis, da lugar a animales con una disminución en su tamaño corporal. En el momento del nacimiento, no todas las crías Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> son más pequeñas que sus hermanos heterocigotos y que los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>. Sin embargo, a lo largo del crecimiento de los animales se hace evidente la disminución en su peso corporal, aproximadamente de un 20% en el caso de las hembras y de un 40% menor en los machos en comparación con los animales control (Fig. R-28), siendo significativa la diferencia de pesos alrededor de los 3 meses de edad.



**FIGURA R-28. LOS ANIMALES  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$ ;K5-Cre $^{\text{T/+}}$  SON DE MENOR TAMAÑO.** Gráfico de pesos de animales  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$ ,  $\text{Sur8}^{\text{flox/+}};\text{K5-Cre}^{\text{T/+}}$  y  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}};\text{K5-Cre}^{\text{T/+}}$ , cuyos genotipos fueron analizados por PCR. El peso de los machos se muestra en el gráfico superior y el de las hembras en el gráfico inferior. Los animales fueron pesados en los intervalos indicados y representados acorde a su edad en días. El número de animales empleados en el seguimiento también se indica. Las barras de error muestran la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , los valores que no llevan asterisco no son significativos.

#### 4.2.2 Los ratones deficientes en Sur8 poseen el pelo ondulado, seguido de una alopecia creciente

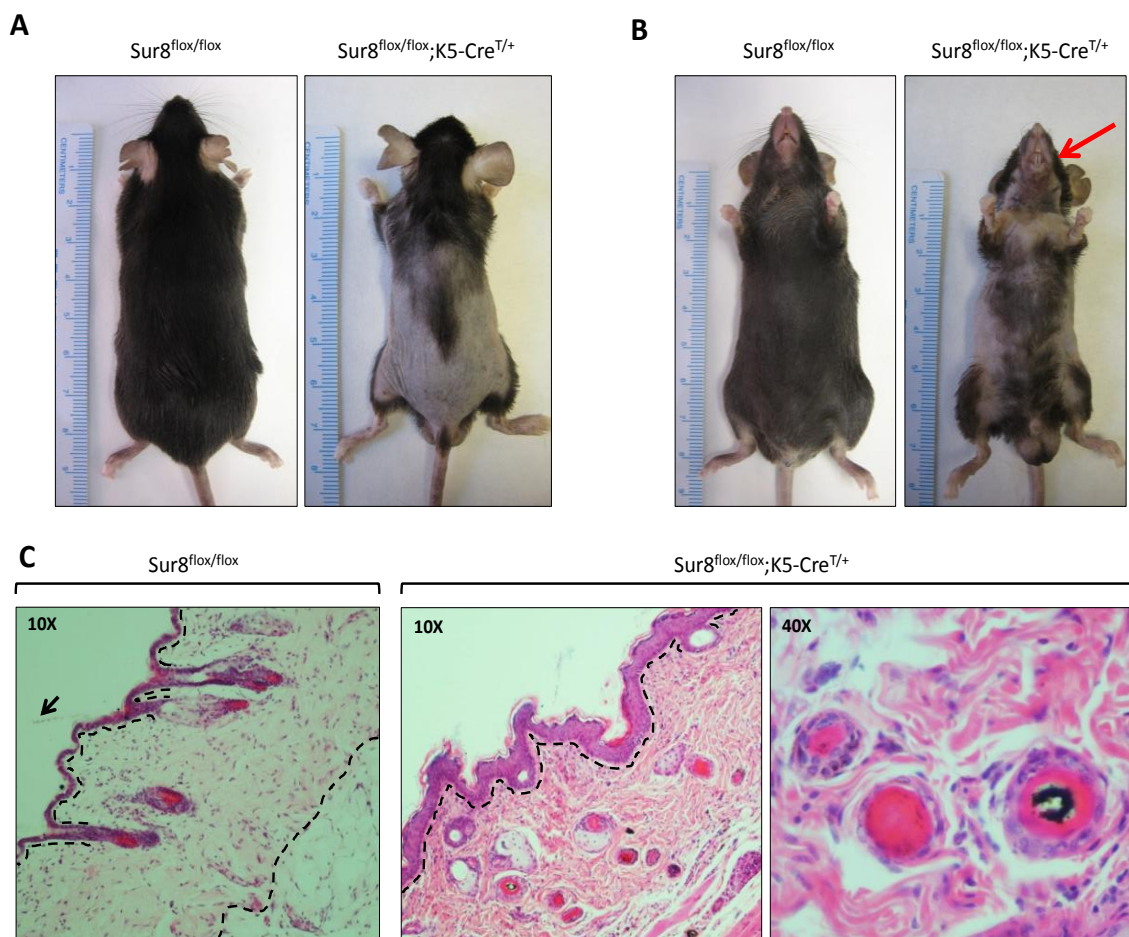
Aunque el menor tamaño de los animales  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}};\text{K5-Cre}^{\text{T/+}}$  permite identificar de forma temprana a algunos individuos, la característica más fácilmente distinguible es la presencia de vibrisas cortas, encrespadas y rizadas durante la primera semana de vida postnatal, en comparación con los animales control que tienen unas vibrisas largas y rectas. A lo largo de los primeros 8-10 días de vida, de estos ratones emerge un pelaje ondulado y desordenado, más obvio a medida que crecen (Fig. R-29A). Por el contrario, los animales control poseen pelos orientados paralelamente entre sí en dirección anteroposterior. Observados al microscopio óptico, la diferencia entre los pelos del dorso de estos animales es también evidente. Los pelos de los ratones KO presentan una morfología ondulada en forma de S- y septos irregulares con inmersión de varias células, mientras que los pelos control presentan septos compuestos solamente de una fila de células pigmentadas (Fig. R-29B).



**FIGURA R-29. LOS RATONES DEFICIENTES EN SUR8 POSEEN EL PELO ONDULADO.** (A) Apariencia del pelo ondulado con vibrisas rizadas de un ratón KO de 18 días de edad; (B) Imágenes de microscopio de campo claro mostrando la comparación entre la morfología de pelos dorsales de un animal  $Sur8^{flox/flox}$  y un  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  de 18 días de edad (Imágenes superiores). Detalle de la septulación de uno de estos pelos (Imágenes inferiores).

Sin embargo, después de 3 semanas de edad, el pelo ondulado empieza a ser reemplazado progresivamente por pelo menos ondulado y débil que comienza a caer con el aumento de edad de los animales, dando lugar a zonas de alopecia más marcadas en la mitad y parte posterior del dorso, áreas del muslo y zona ventral del cuello del animal (Fig. R-30AB). Por el contrario, las vibrisas se mantienen curvadas. El grado de alopecia es variable, encontrando animales con mayor o menor densidad capilar que va evolucionando a lo largo del tiempo. También se aprecia una malformación en el labio inferior presente en todos los animales KO para Sur8 (Fig. R-30B).

El análisis de los folículos pilosos en los cortes histológicos, muestra displasia folicular caracterizada por folículos dilatados con depósitos de queratina en su interior y anomalías estructurales como reducción o pérdida de la ORS o IRS. Además, no se observa la salida de los folículos a través de la epidermis hacia el exterior, lo que explica las zonas de alopecia observadas en el ratón. Estas observaciones contrastan con la estructura normal de los folículos pilosos de los ratones control en los que sí se aprecia la protrusión del pelo a través de la epidermis (Fig. R-30C, flecha).

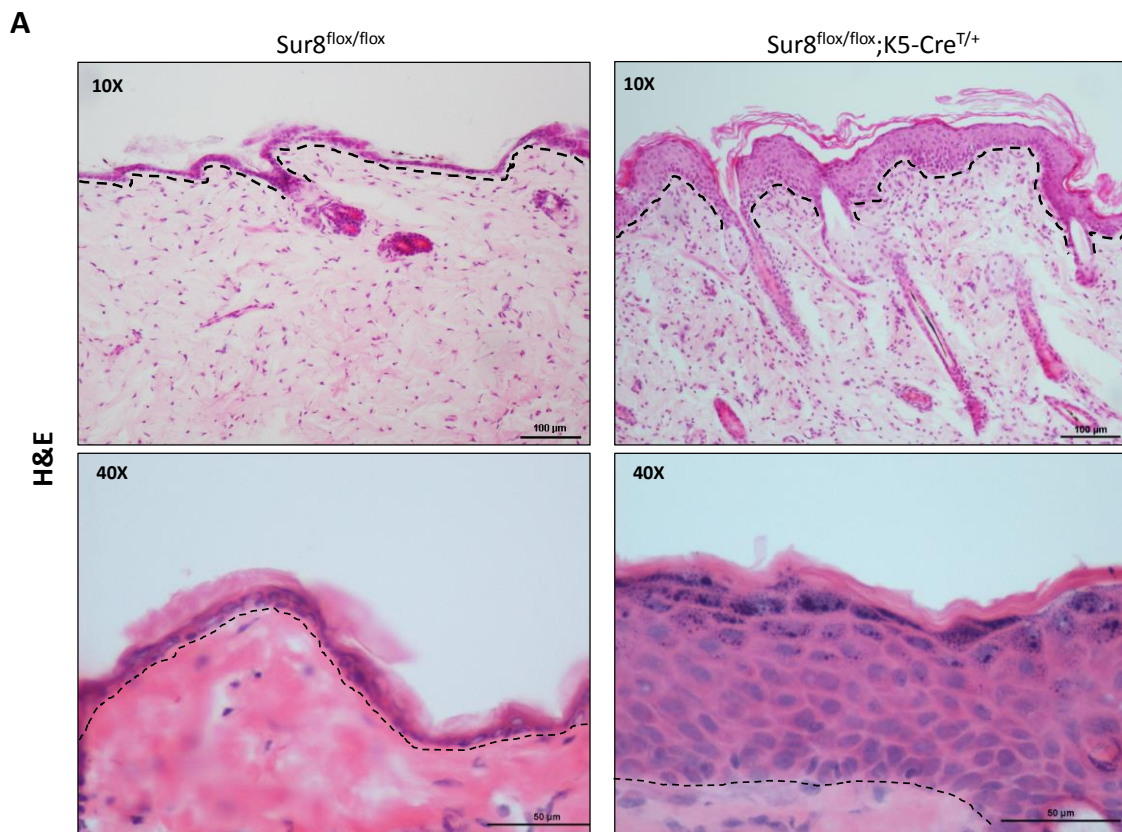


**FIGURA R-30. LOS ANIMALES KO PARA SUR8 EN EPIDERMIS SUFREN UNA ALOPECIA CRECIENTE CON EL TIEMPO.** Comparación de la apariencia de animales  $Sur8^{flox/flox}$  y  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  de 5 meses de edad: (A) Región dorsal con alopecia en la mitad posterior extendida hacia los flancos; (B) Región ventral con pérdida de pelo en regiones axilares e inguinales. La flecha roja marca el acortamiento del labio inferior en los animales KO; (C) Tinción de H&E de una sección de piel dorsal de un ratón  $Sur8^{flox/flox}$  (izquierda) y un  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  (derecha), representativos de animales de 5 meses de edad. Se señala la extensión correspondiente a epidermis, dermis y capa adiposa con líneas discontinuas. En el ratón  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  se aprecian folículos con estructura alterada, tejido granuloso reemplazando a la capa adiposa e implantación profunda de los folículos próximos a la capa muscular. También se observa hiperplasia epidérmica. Detalle de algunos folículos, con aumento al 40X, en la imagen de la derecha.

#### 4.2.3 Los ratones $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ presentan hiperplasia en la epidermis

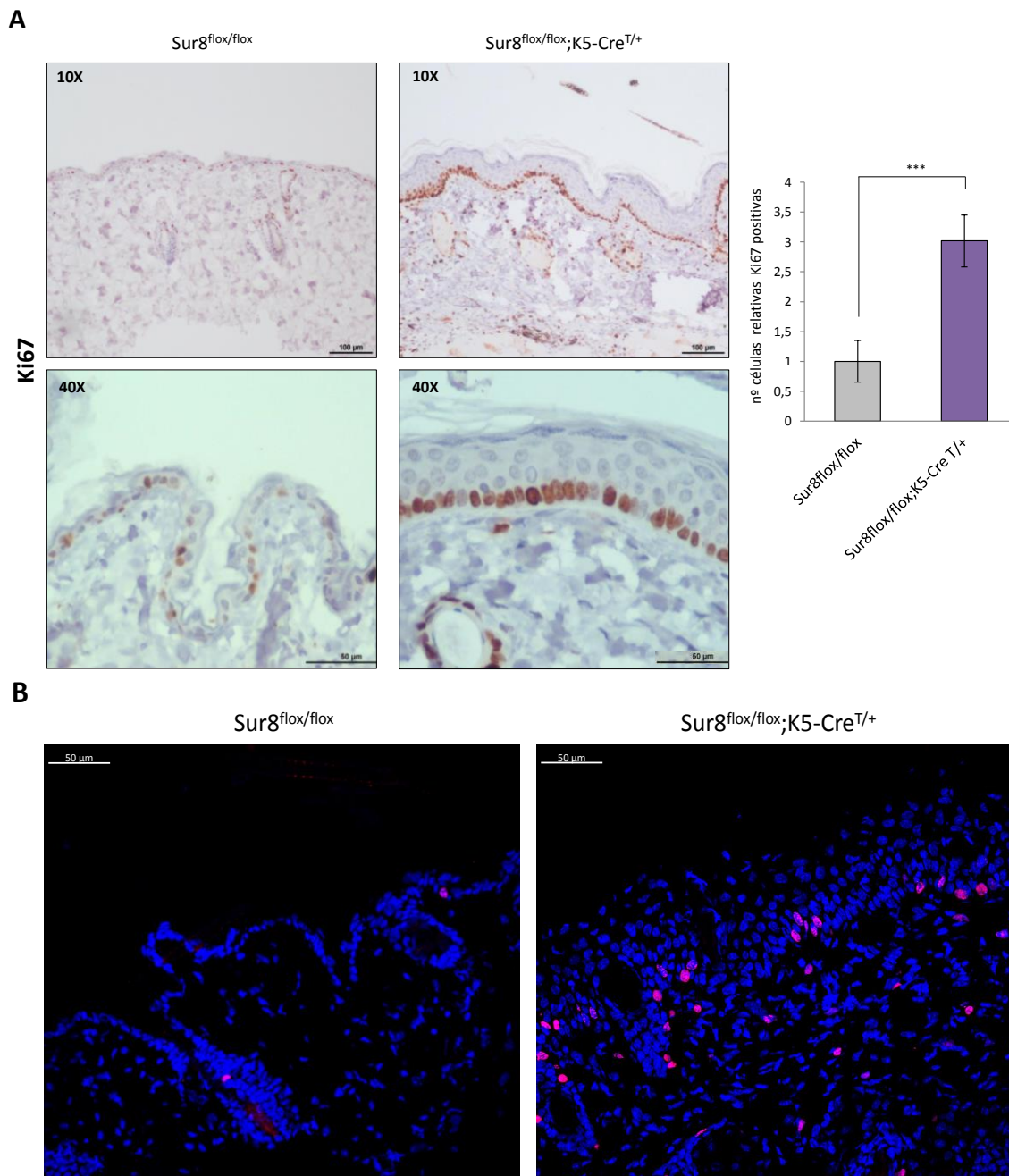
Además de las ya comentadas alteraciones en los folículos pilosos, el estudio de la piel de los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  reveló un engrosamiento de la epidermis ( $56,85 \mu m \pm 9,26$  frente a  $16,67 \mu m \pm 5,49$  de los controles), junto con abundante deposición de queratina en la superficie. Estas lesiones contrastan con la morfología normal de la piel de los ratones  $Sur8^{flox/flox}$ , donde la epidermis posee solamente 1 o 2 capas de células y no se aprecia tanta queratina en su superficie (Fig. R-31A).





**FIGURA R-31. HIPERPLASIA EN LA EPIDERMIS DEFICIENTE EN SUR8.** Tinción de H&E de secciones de piel dorsal de 2 ratones representativos de animales de 5 meses de edad, Sur8<sup>flox/flox</sup> (izquierda) y un Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> (derecha). La separación entre la epidermis y dermis se señala con una línea discontinua tanto en las imágenes a 10X como 40X de aumento.

Para identificar las células en proliferación en la epidermis de estos animales, se detectó por IHQ una proteína nuclear asociada a la división celular, Ki67. Como se muestra en la Figura R-32A, en la epidermis de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> hay un incremento significativo en el número de células en proliferación en la capa basal (3 veces más proliferación), mientras que en la epidermis control solamente algunas células se encuentran en división. Además, el análisis de las células que se encuentran en fase de síntesis de DNA mediante la incorporación del análogo EdU (Fig. R-32B), confirma el aumento del número de células en proliferación en la epidermis deficiente en Sur8 en comparación con los animales control. Los resultados muestran como la hiperplasia de la epidermis KO parece deberse a un aumento de actividad de las células proliferativas.

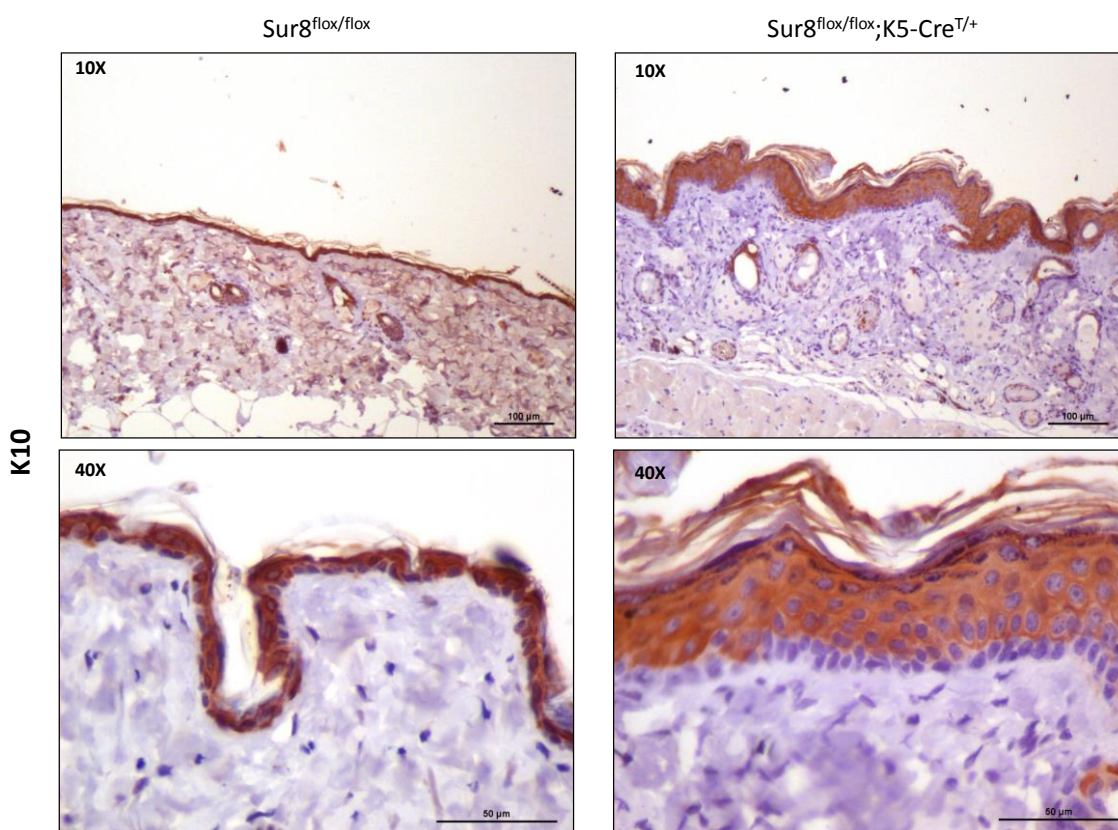


**FIGURA R-32. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN EN LA EPIDERMIS DEFICIENTE EN SUR8.** (A) IHQ en piel dorsal de animales representativos de cada genotipo con 5 meses de edad, empleando el anticuerpo específico  $\alpha$ -Ki67 para la detección de células en proliferación. Las células positivas aparecen teñidas de color marrón. En el gráfico se muestra la cuantificación del número de células positivas para Ki67 en 3 mm de epidermis de 4 animales KO, respecto del mismo número de animales control. Las barras de error muestran la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; (B) Imágenes de microscopía de fluorescencia resultantes del ensayo *Click-it* de proliferación en secciones de piel dorsal de ratones de 5 meses de edad, Sur8<sup>flox/flox</sup> y un Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y el marcaje de las células en fase S se realizó por detección de la incorporación de EdU al DNA con  $\alpha$ -Alexa Fluor 594 (rosa), tras un pulso de 2h.



La epidermis de estos animales también se analizó por IHQ para identificar la naturaleza de las células que conforman la epidermis hiperplásica mediante la expresión de distintos marcadores. El análisis de la expresión de K10 mostró un incremento en la extensión de células positivas para este marcador característico de células suprabasales del estrato espinoso (Fig. R-33). Sugiriendo una diferenciación aberrante de estas células.

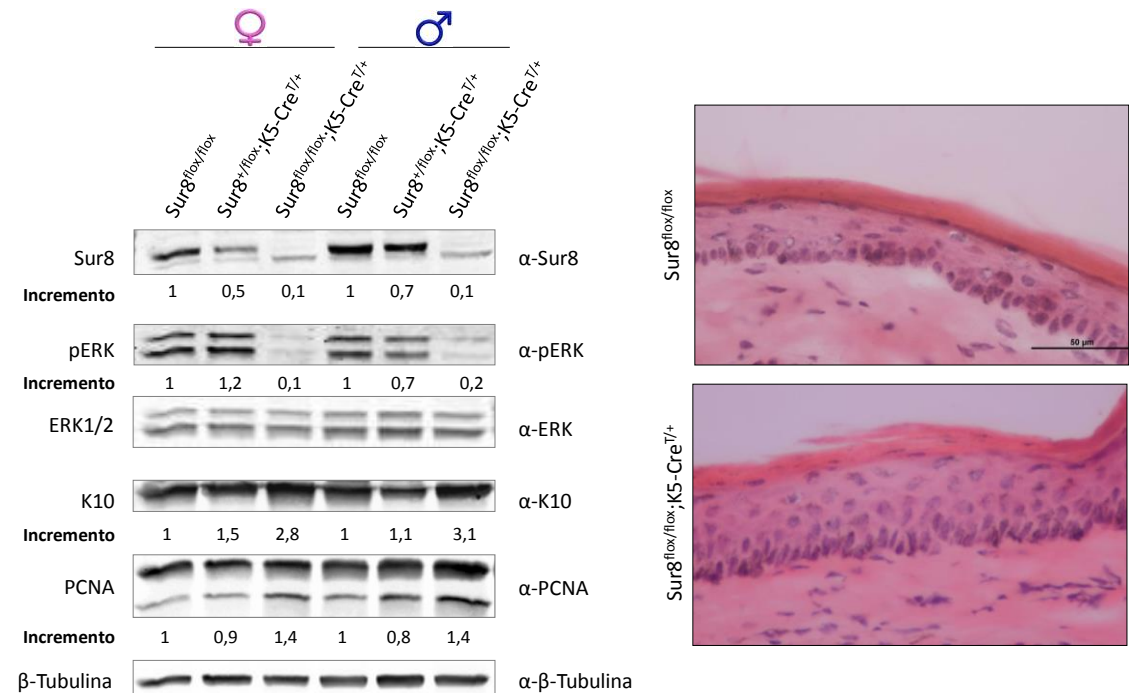
Los resultados obtenidos con los animales heterocigotos son similares a los de los animales control. La apariencia de la epidermis de los ratones  $Sur8^{flox/+};K5-Cre^{T/+}$  fue indistinguible de la de sus hermanos de camada  $Sur8^{flox/flox}$  y en la tinción con H&E. El análisis de los cortes histológicos, no reveló diferencias en el ratio de proliferación de ambos tipos de animales (medida por Ki67), ni en la distribución de algunos marcadores epidérmicos como K10 analizados por IHQ e IF (datos no mostrados).



**FIGURA R-33. ANÁLISIS DE LA HIPERPLASIA DE LOS ANIMALES  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ .** Imágenes de IHQ mostrando la expresión de la K10 en secciones de piel dorsal de animales  $Sur8^{flox/flox}$  y  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ . Se empleó  $\alpha$ -K10 como anticuerpo primario. Las células con marcaje positivo aparecen en color marrón. Se muestran los resultados obtenidos en un ratón de 5 meses de edad representativo de cada genotipo.

Complementando los resultados anteriores, se analizó por WB la expresión de distintos marcadores en queratinocitos aislados de la cola de estos animales. En la Figura R-34, se muestra como la eliminación de Sur8 va ligada a una disminución en la fosforilación basal de ERK. Además, se observa un ligero aumento en la expresión de K10 y PCNA, lo que

correlaciona con los resultados obtenidos por IHQ en el dorso, pese a que la hiperplasia mostrada en la cola de los animales es menos aparente que la del dorso.

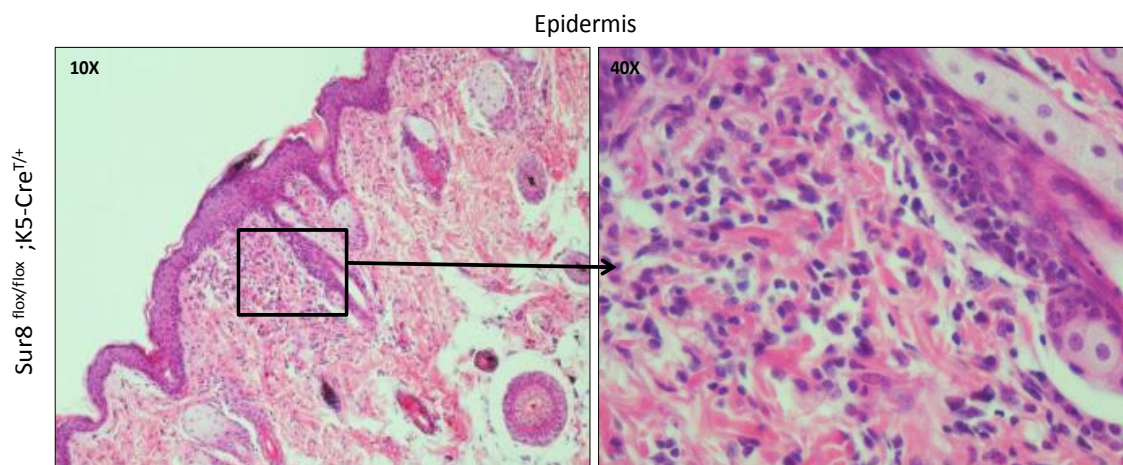


**FIGURA R-34. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE QUERATINOCITOS AISLADOS DE LA COLA DE ANIMALES *SUR8<sup>FLOX/FLOX</sup>;K5-CRE<sup>T/+</sup>*.** WB de los lisados celulares obtenidos de queratinocitos aislados de la cola de animales machos y hembras de 5 meses de edad de los genotipos indicados. La detección de Sur8, ERK fosforilado y ERK se realizó con anticuerpos específicos α-Sur8, α-pERK, α-ERK, respectivamente. También se emplearon anticuerpos α-β tubulina α-K10 y α-PCNA. Los “incrementos” muestran el ratio de expresión Sur8/tubulina, K10/tubulina, PCNA/tubulina y pERK/ERK, obtenidos de la cuantificación de la intensidad de cada señal en cada punto. A la derecha se muestran imágenes de la tinción de H&E de la piel de la cola de esos animales.

#### 4.2.4 Inflamación epidérmica y hematopoyesis extramedular en los ratones KO para Sur8 en epidermis

Durante el examen anatómico de los animales *Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>*, se detectó una adenomegalia severa de los ganglios cervicales (de 3 y 5 mm de diámetro) y ganglios mesentéricos. Asimismo, los animales presentaron un aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia).

Esta fuerte reacción inflamatoria presente en los animales KO, se observó también durante el estudio de la epidermis, en la que se detectó la presencia de células inflamatorias infiltradas en algunas áreas (Fig. R-35).

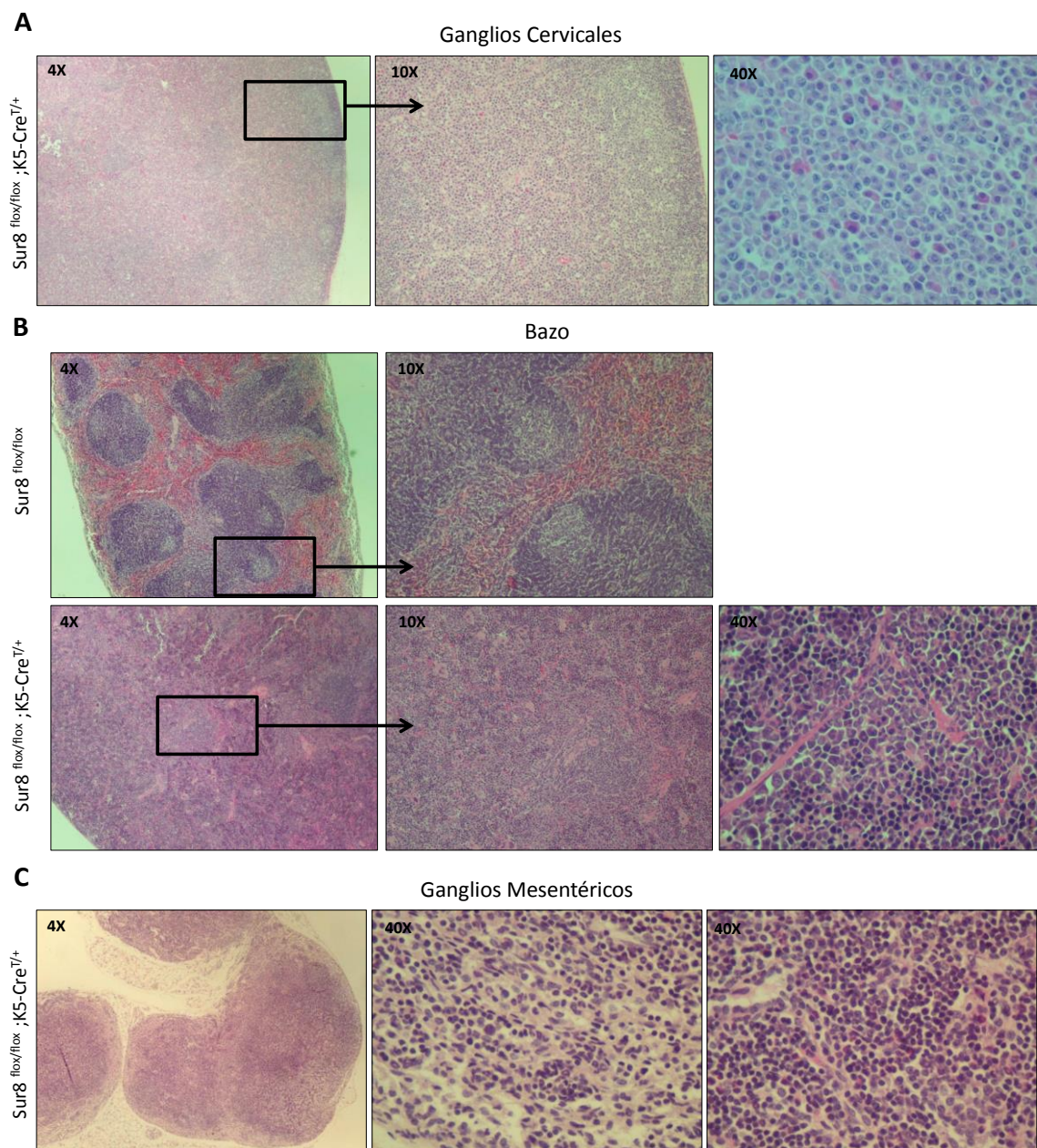


**FIGURA R-35. INFLAMACIÓN EPIDÉRMICA EN LOS RATONES KO PARA SUR8 EN EPIDERMIS.** Secciones de epidermis de animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  de 5 meses de edad teñidas con H&E. El área aumentada de tamaño se representa con un recuadro de color negro. Los diferentes aumentos empleados también se indican.

En el examen histológico de los ganglios cervicales, apenas se aprecia la estructura ganglionar, ya que el ganglio presenta hiperplasia de células plasmáticas en distintos estadios de desarrollo, lo que da lugar al aumento exagerado de tamaño de estos ganglios (Fig. R-36A). El análisis histológico del bazo reveló un infiltrado celular en la pulpa roja, lo que dificultó la diferenciación entre ésta y la pulpa blanca. En la pulpa roja se puede identificar una abundante cantidad de precursores mieloides, eritroides y megacariocitos, característicos de la hematopoyesis extramedular. Por el contrario, en el bazo de los ratones control se aprecia claramente su estructura característica, así como los folículos linfoides con centros germinales (Fig. R-36B). En la hiperplasia ganglionar observada en los ganglios mesentéricos, se identificó la presencia de precursores mieloides y eritroides en el área paracortical, aunque en una cantidad mucho menor que en el bazo (Fig. R-36C).

Cabe destacar que en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  con 5 meses de edad, el timo no está presente o se encuentra en regresión por apoptosis generalizada, sin estar relacionadas estas lesiones con la involución tímica que se produce cuando el animal va creciendo (Anexo 8).



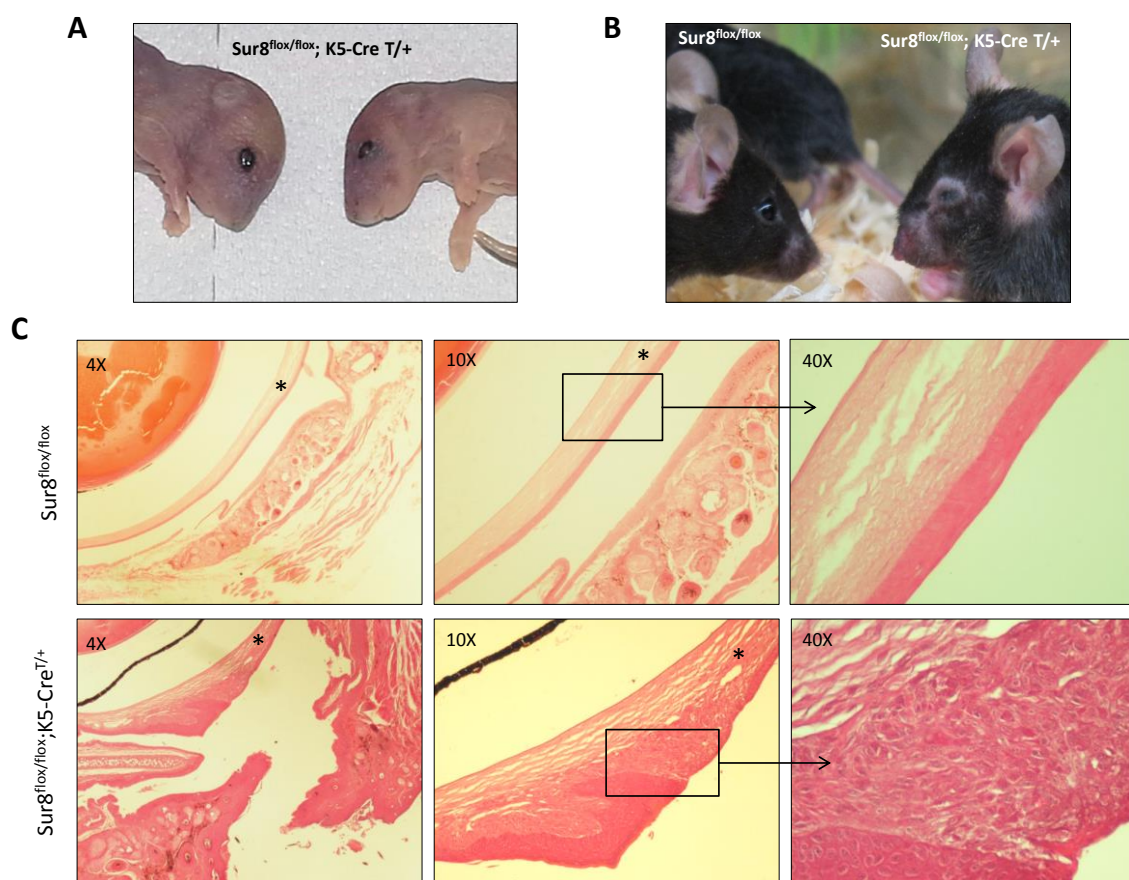


**FIGURA R-36. HEMATOPOYESIS EXTRAMEDULAR EN LOS RATONES KO PARA SUR8 EN EPIDERMIS.** Secciones de diferentes órganos teñidos con H&E de animales de 5 meses de edad: Ganglios cervicales (A), Bazo (B) y Ganglios mesentéricos (C). Las áreas aumentadas de tamaño se representan con un recuadro de color negro. Los diferentes aumentos empleados también se indican. En el caso de los ganglios no hay tejido control comparable debido al pequeño tamaño que presentan en condiciones normales.

#### 4.2.5 Los animales $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ presentan anomalías oculares

Además del fenotipo del pelo ondulado seguido de una marcada alopecia, que exhibe un 100% de penetrancia en los KOs, también se encontraron defectos en los ojos. Estos defectos son variables en apariencia, bilateralidad y severidad entre animales e incluso entre los ojos de un mismo animal. En primer lugar, estos animales no presentan los párpados ocluidos en el momento del nacimiento (Fig. R-37A), probablemente por un fallo en la fusión de los

párpados, mientras que los animales normales mantienen los párpados cerrados hasta los días 11-13. A lo largo del desarrollo postnatal, aparecen anomalías oculares que incluyen opacidad superficial, tamaño reducido del globo ocular (microftalmia) y cierre parcial de los ojos, comprometiendo la visión de los animales (Fig. R-37B). El análisis mediante secciones histológicas reveló que la mayoría de estas anomalías se encuentran en la córnea, mientras que otros tejidos como la membrana nictitante y los párpados se encuentran completos y no presentan alteraciones. En la córnea se observa queratitis, acantosis e hiperparaqueratosis. Además, distinguimos regiones de fibrosis, infiltrado inflamatorio y vasos sanguíneos de nueva formación (Fig. R-37C).



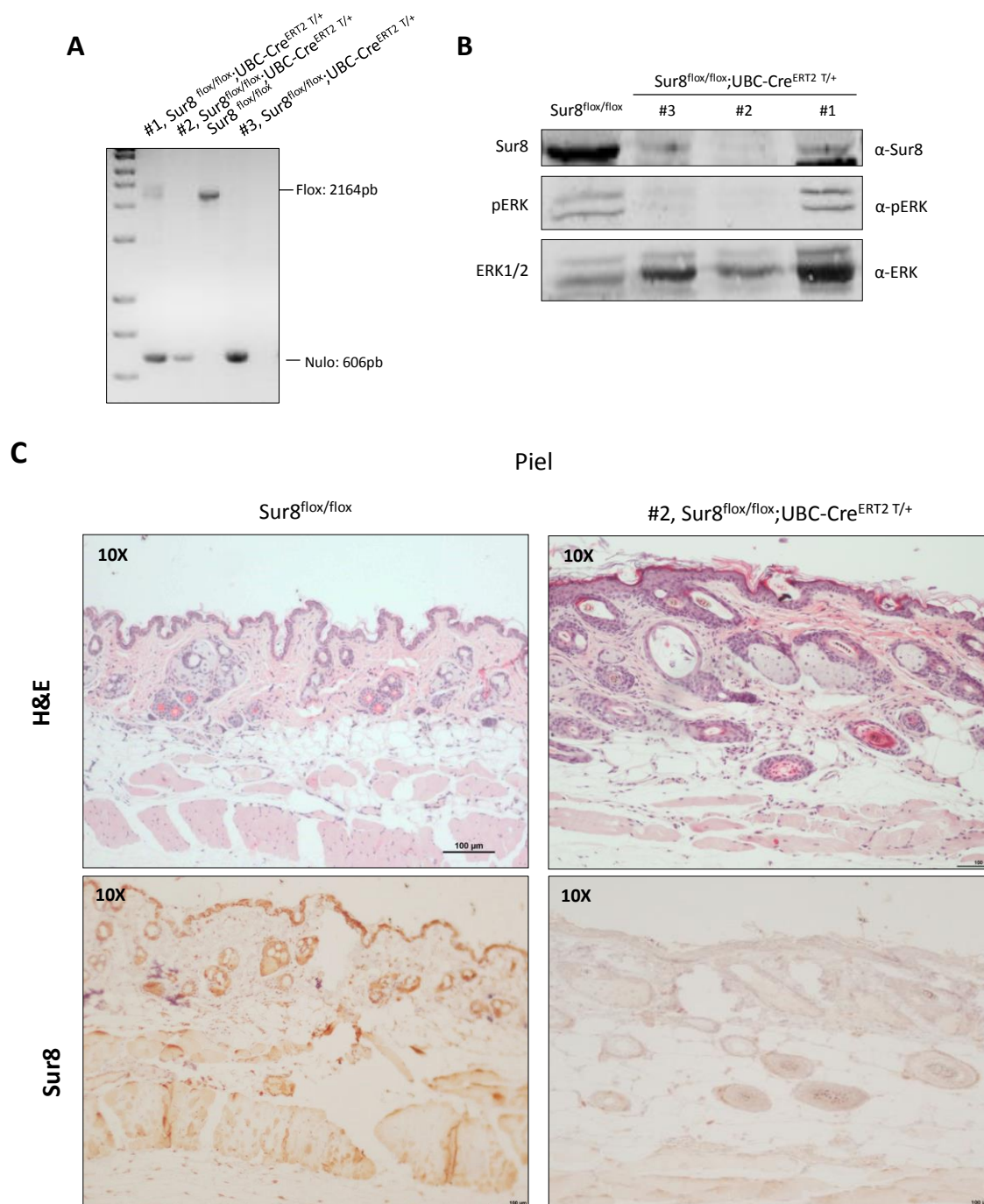
**FIGURA R-37. LOS ANIMALES SUR8<sup>FLOX/FLOX</sup>;K5-CRE<sup>T/+</sup> PRESENTAN ANORMALIDADES OCULARES.** (A) Imagen de dos animales KO recién nacidos mostrando los ojos abiertos; (B) Imagen comparativa de la apariencia de los ojos de un animal Sur8<sup>flox/flox</sup> frente a un animal Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. Ambos de 4 meses de edad. Obsérvese la microftalmia visible en el animal Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. (C) H&E de secciones representativas de un ojo de un adulto control y un ojo de un ratón Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>. La córnea se señala mediante un asterisco (\*) y las zonas aumentadas aparecen indicadas con un recuadro.

## 5. INFLUENCIA DE SUR8 EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL ORGANISMO ADULTO

Teniendo en cuenta que la delección de Sur8 en línea germinal o específicamente en células endoteliales resulta en letalidad embrionaria (Yi *et al.*, 2010) y dada la imposibilidad de obtener animales KO heterocigotos, recurrimos al estudio de los efectos de la eliminación de Sur8 inducida en el animal adulto. Para determinar las consecuencias de la pérdida de Sur8 en animales a partir del destete, se usó una línea de ratones transgénicos con la recombinasa Cre fusionada a una forma mutada del receptor de estrógenos (ERT2), activada selectivamente por la presencia de tamoxifeno. En este caso, Cre<sup>ERT2</sup> se expresa bajo control del promotor de la UBC humana, activo en la mayoría de tejidos del organismo (Schwenk *et al.*, 1998). El cruce de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup> con la línea UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup>, dio lugar a ratones que perderán Sur8 de forma controlada espacial y temporalmente a través de la administración de tamoxifeno.

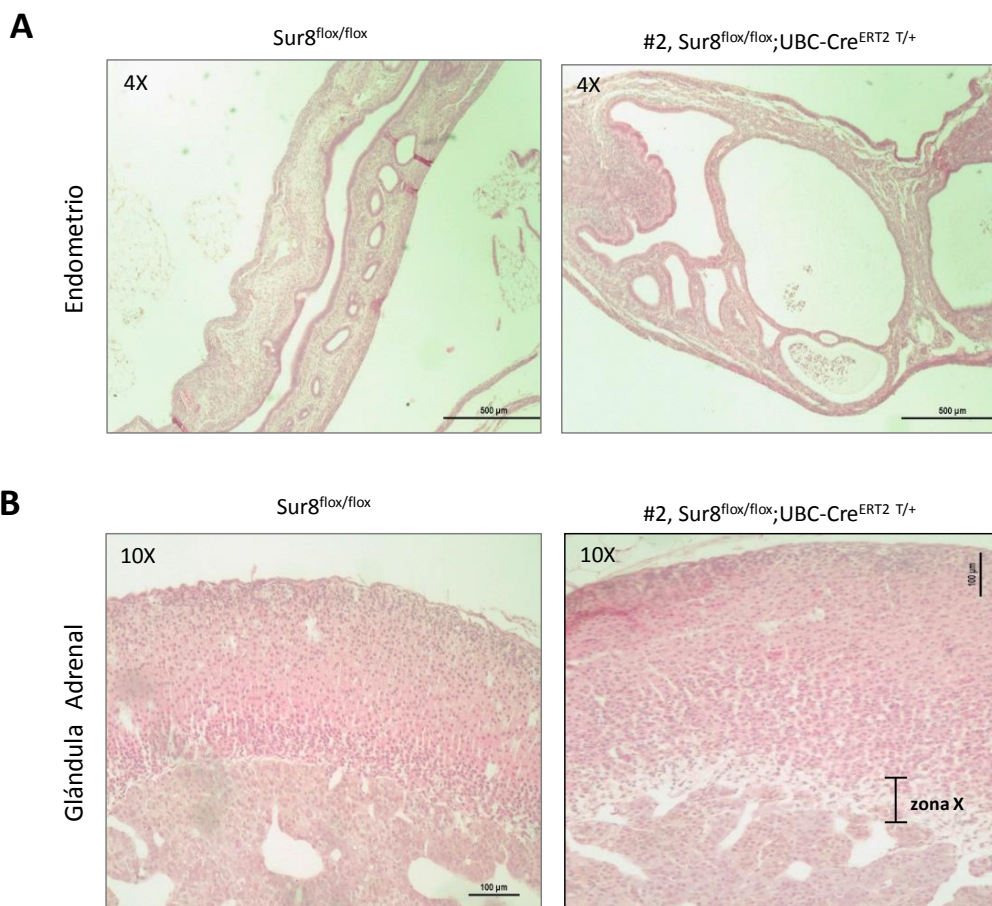
Para testar la eficacia de la activación de la recombinasa tratamos animales de 3-5 meses de edad con una inyección intraperitoneal de tamoxifeno durante 5 días. Después de un mes desde el final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados. El DNA genómico de la cola de los animales se analizó por PCR (Fig. R-38A), y nos indica que se está produciendo la eliminación del gen, aunque existe variabilidad en el grado de delección (mostrando los animales número #2 y #3 los mayores grados de delección). El análisis por WB de la proteína extraída corroboró la eliminación de Sur8, así como la reducción de pERK, principalmente en los animales #2 y #3 en piel (Fig. R-38B). También, fue comprobada la falta de expresión de Sur8 por IHQ en la piel dorsal de estos animales (Fig. R-38C). Además, en la Figura R-38C se observan alteraciones en los folículos pilosos, insertados en la grasa subepidérmica.





**FIGURA R-38. DELECCIÓN DE SUR8 EN LOS ANIMALES *SUR8<sup>FLOX/FLOX</sup>;UBC-CRE<sup>ERT2 T/+</sup>*.** (A) PCR para detectar la eliminación del exón 2 de *Sur8* en animales con diferentes genotipos, tras el tratamiento con tamoxifeno. Se indican los tamaños de los productos de amplificación; (B) Detección de α-Sur8, α-pERK y α-ERK por WB en extractos de queratinocitos aislados de los animales *Sur8<sup>flox/flox</sup>* y *Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup>*; (C, superior) Secciones de piel teñidas con H&E de un animal control *Sur8<sup>flox/flox</sup>*, en comparación con un animal KO para *Sur8*. (C, inferior) IHQ α-Sur8 realizada en la piel de estos mismos animales.

En la necropsia realizada en los animales tras un mes de tratamiento, solo se detectó en los KO hiperplasia del endometrio (Fig. R-39A) y el mantenimiento de una región característica de la glándula adrenal denominada “zona X”. La zona X degenera normalmente en los primeros meses de vida, tal y como se detectó en los animales control (Fig. R-39B).



**FIGURA R-39. ALTERACIONES EN EL ENDOMETRIO Y EN LA GLÁNDULA ADRENAL DE LOS RATONES KO PARA SUR8.** (A) Histopatología de secciones de endometrio (A) y glándula adrenal (B) de ratones de 5 meses de edad con los genotipos indicados tras un mes de tratamiento, teñidas con H&E.

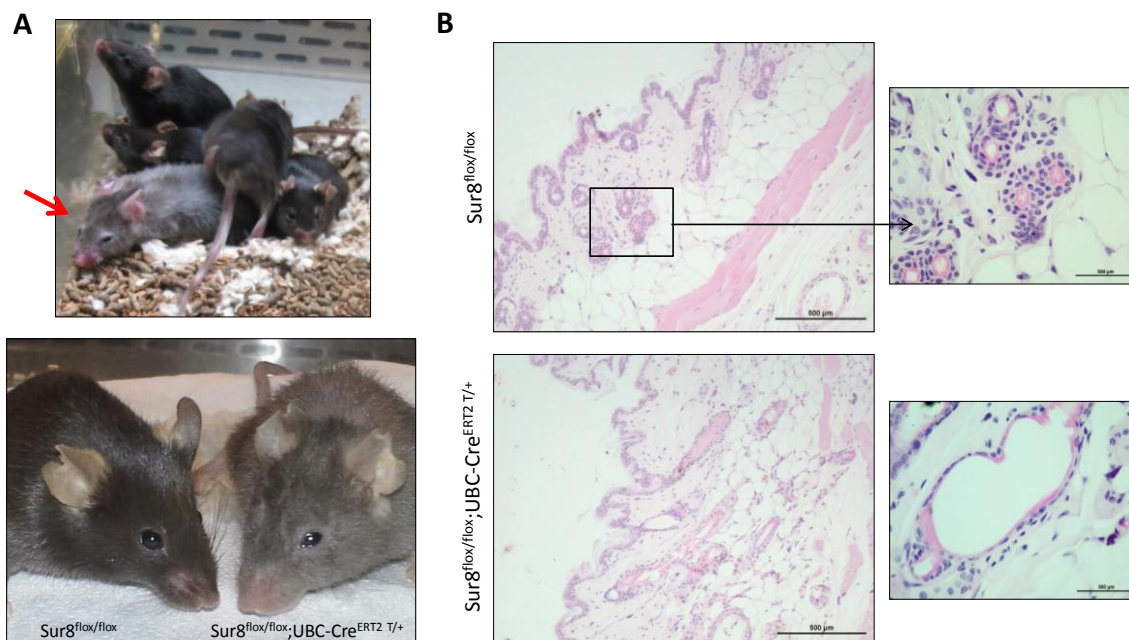
### 5.1 LA ELIMINACIÓN DE SUR8 PROVOCA LA APARICIÓN DE FENOTIPOS RELACIONADOS CON ENVEJECIMIENTO

Para estudiar los efectos de la eliminación de Sur8 a largo plazo, se realizó un protocolo de administración de tamoxifeno empleando *pellets* de comida suministrados durante varios meses. Los resultados obtenidos con animales tratados a partir del destete, muestran como después de 3-4 meses desde el comienzo del tratamiento, se empiezan a detectar fenotipos asociados a envejecimiento en los animales *Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2</sup> T/+*.

En la Figura R-40A, se puede observar el fenotipo visible que muestran estos individuos. Estas alteraciones incluyen encanecimiento generalizado y reducción de la densidad capilar creciente tras un año de tratamiento, mientras que los animales control poseen una apariencia similar a los ratones sin tratar de la misma edad. En el análisis histológico de la piel de los primeros animales sacrificados, de 1 año de edad, se observan folículos pilosos dilatados en los animales *Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2</sup> T/+* con implantación profunda cercanos a la capa muscular, en



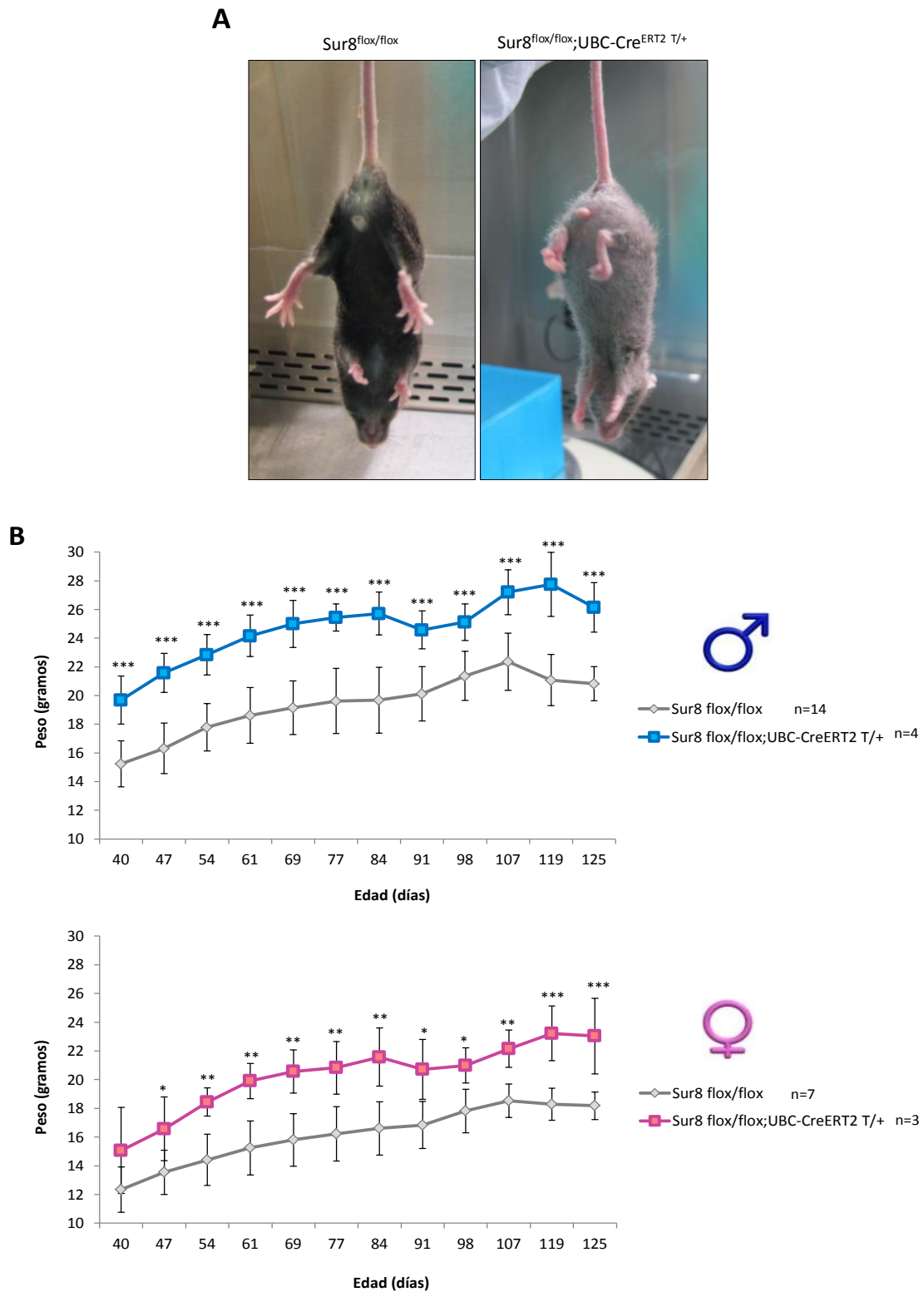
comparación con los animales control (Fig. 40B). Además, la hiperplasia endometrial quística presente en los animales KO del primer experimento (Fig. R-39A anterior), también se observa con gran intensidad en estos animales.



**FIGURA R-40. APARIENCIA DE LOS ANIMALES ADULTOS KO PARA SUR8.** (A) Fotografías obtenidas de varios animales durante el experimento, mostrando la apariencia de los  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}; \text{UBC-Cre}^{\text{ERT2 T/+}}$  que se diferencian de sus hermanos controles de camada fácilmente. La flecha roja señala uno de los ratones KO; (B) Tinción de H&E de una sección de piel dorsal de ratones de 1 año de edad,  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}$  y un  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}; \text{UBC-Cre}^{\text{ERT2 T/+}}$ . A la derecha, se muestra el detalle de algunos folículos pilosos en ambos animales. En el ratón KO se aprecian folículos con estructura alterada implantados en la capa adiposa. El área aumentada se indica con un recuadro de color negro.

Por otro lado, los animales KO para Sur8 presentan problemas de coordinación, hipoactividad y poseen una característica retracción de sus extremidades traseras al estar suspendidos en el aire a través de la cola (TST, *tail suspension test*), lo que sugiere algún tipo de defecto neuromuscular (Fig. R-41A).

Estos fenotipos, fueron acompañados de un aumento en el peso corporal de los animales  $\text{Sur8}^{\text{flox/flox}}; \text{UBC-Cre}^{\text{ERT2 T/+}}$  a lo largo del tratamiento, detectable incluso desde el primer mes postratamiento. El incremento de peso es de un 25-30% mayor que en los animales control después de 6 meses de tratamiento (Fig. R-41B).



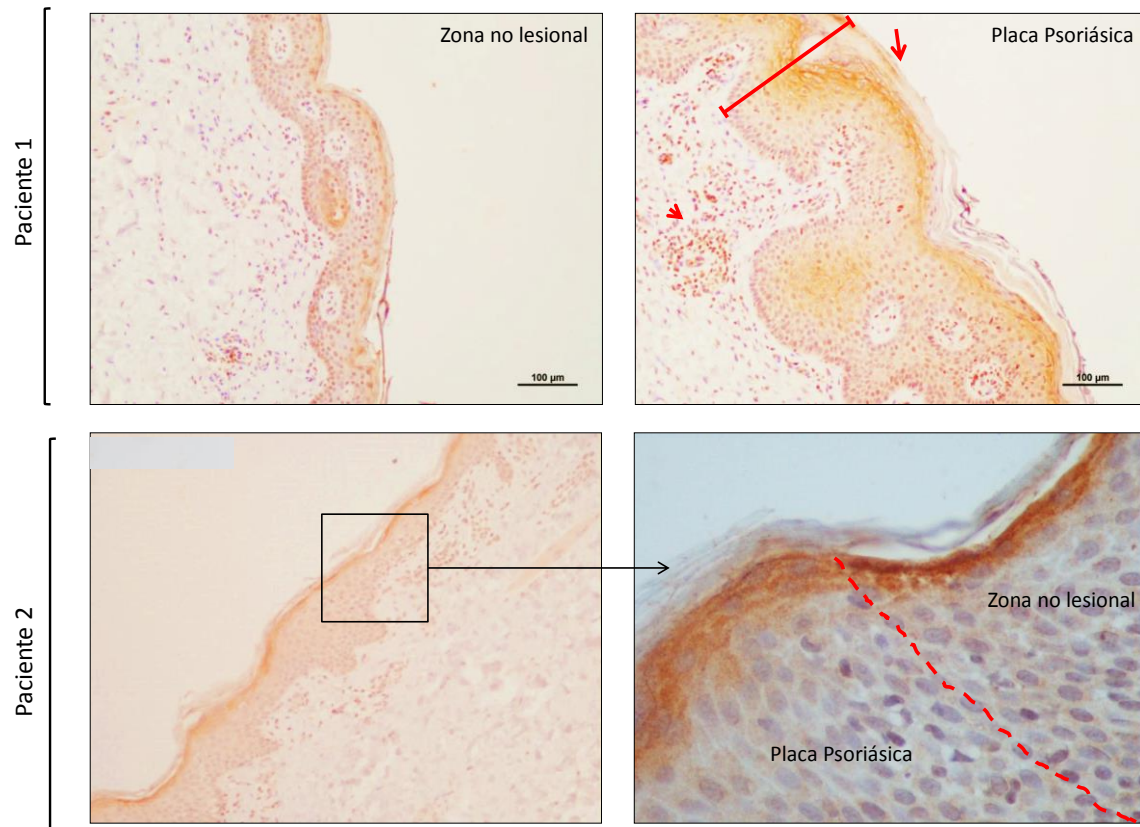
**FIGURA R-41. ALTERACIONES NEUROMUSCULARES Y AUMENTO DEL PESO CORPORAL EN LOS ANIMALES Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup>.** (A) Ratón KO para Sur8 mostrando la retracción de las patas traseras característica de estos animales, en comparación con la respuesta de un animal control; (B) Gráfica de la variación de pesos obtenida de machos (gráfico superior) y hembras (gráfico inferior) con los genotipos indicados, a lo largo del tiempo. Se indican el número de individuos registrados por genotipo y los intervalos de tiempo en los que se analizaron. Las barras de error muestran la desviación estándar. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , los valores que no se indican con asteriscos no son significativos.

Los resultados muestran como la delección de Sur8 en ratones jóvenes tras el destete, permite el desarrollo de varios desórdenes que recuerdan al proceso de envejecimiento. Aunque existe variabilidad en la agresividad de estos fenotipos, posiblemente por el diferente grado de delección del gen, estas observaciones sugieren una reducida capacidad regenerativa de los tejidos adultos tras la eliminación de Sur8. Los primeros datos que tenemos de mortalidad de estos animales, estiman su supervivencia alrededor de los 6 meses de edad (el 50% de los animales con el fenotipo más agresivo de delección de Sur8 ha muerto con esta edad). La causa de su muerte parece deberse a una disfunción en la vejiga, pero estamos realizando actualmente el análisis histopatológico de diferentes órganos y tejidos para identificar otras posibles causas.

#### 6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE SUR8 EN MUESTRAS HUMANAS DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCC) Y PSORIASIS

Además de los efectos derivados de la supresión de Sur8, la propia función reguladora de esta proteína podría contribuir significativamente al desarrollo de diferentes patologías. Como primera aproximación, se analizó la expresión de esta proteína en muestras de pacientes con enfermedades epiteliales, entre las que se encuentran la psoriasis y los carcinomas de células escamosas (SCC).

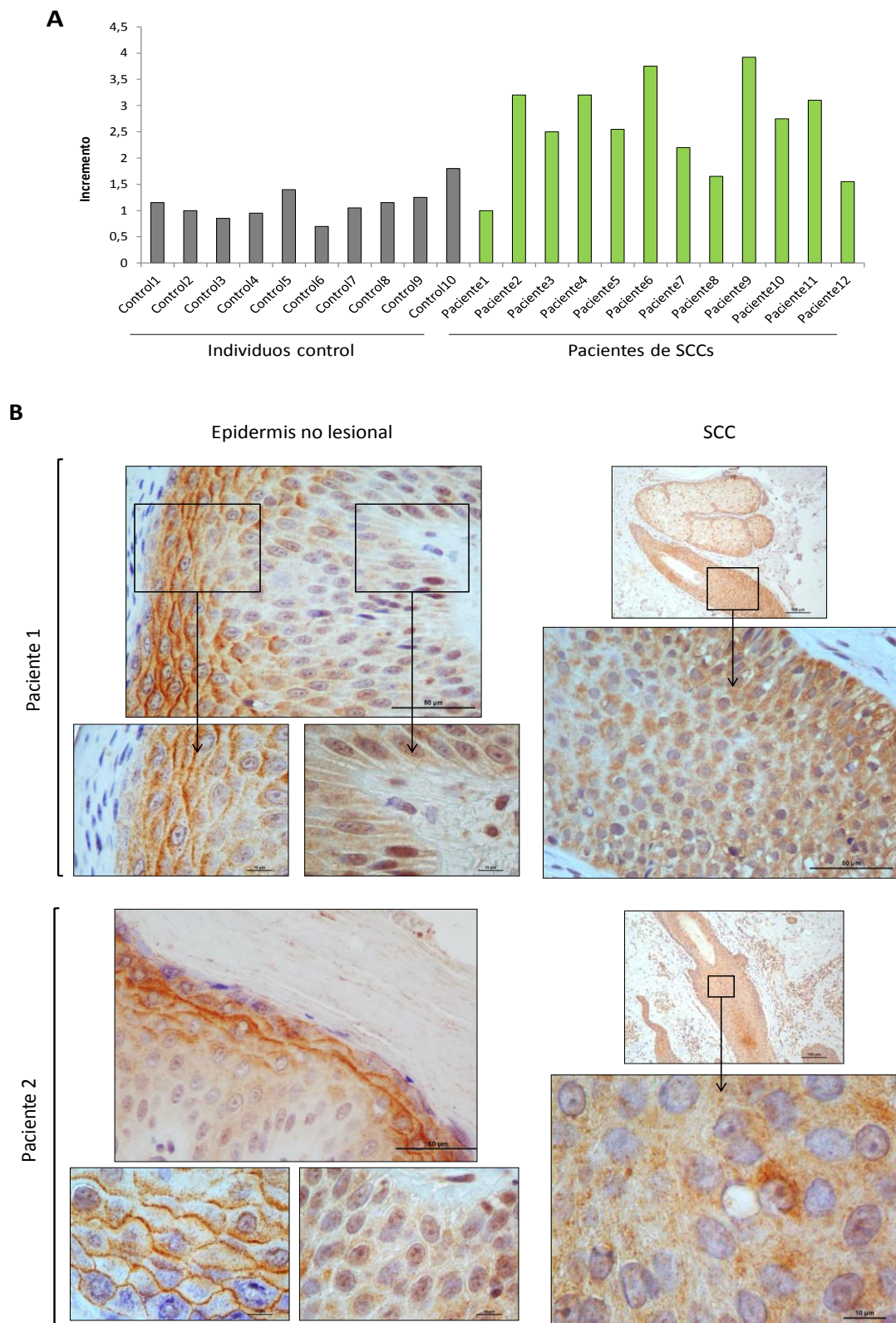
La psoriasis es una enfermedad que afecta a 2-4% de la población y cuya etiología está relacionada con complejas interacciones entre queratinocitos y células inmunes, que dan lugar a una diferenciación aberrante de los queratinocitos y una proliferación exacerbada (Griffiths and Barker, 2007). El estudio de la expresión de Sur8 por IHQ en pacientes con psoriasis (Fig. R-42), muestra que Sur8 no se ve aumentado en el tejido enfermo. En cambio, sí aparece una re-localización en muchos casos membrana/citoplasma, siendo su expresión más citoplasmática en las capas superficiales de las placas psoriáticas.



**FIGURA R-42. EXPRESIÓN DE SUR8 EN PSORIASIS.** Imágenes de IHQ para detectar la expresión de Sur8 en la placa psoriática, en comparación con secciones de zonas no lesionadas de los mismos pacientes. La detección se realizó con  $\alpha$ -Sur8. De color rojo se marca la acantosis (corchete), paraqueratosis (flecha) y la infiltración de células inmunes (punta de flecha) características de este desorden epitelial. Las células con marcaje positivo aparecen en color marrón. Se muestran los resultados de dos pacientes de psoriasis representativos de los 10 analizados.

Por otro lado, consistente con su papel como regulador de la proliferación *versus* diferenciación en la epidermis, la señalización RAS/RAF/MEK/ERK es crucial para la formación de tumores epidérmicos. De hecho, la mayoría de SCC se caracterizan por la activación de la vía de RAS (el 46% presenta mutaciones en H-RAS) y el aumento de actividad de ERK (Khavari and Rinn, 2007). Los resultados mostrados en la Figura R-43A, sugieren que la expresión del mRNA de *SUR8* se encuentra marcadamente aumentada en las muestras de pacientes con SCC, en comparación con las muestras de piel de individuos control. Además, el patrón de expresión de Sur8 por IHQ encontrado en los pacientes de psoriasis también es muy consistente en los SCC (Fig. R-43B). En ellos observamos un cambio en la localización subcelular de Sur8, ya que esta proteína parece tener una distribución citoplasmática en los tumores, mientras que se encuentra localizado preferentemente en la membrana plasmática de las células de las capas más superficiales de la epidermis y nuclear en algunas células basales.





**FIGURA R-43. EXPRESIÓN DE SUR8 EN SCC.** (A) Cuantificación por qRT-PCR de la expresión de *SUR8* empleando cebadores específicos en muestras humanas de piel de individuos sanos y de pacientes con SCC, cedidas por el Dr. Juan Guinea-Viniegra (CNIO). La expresión de *SUR8* se normalizó respecto a *βACTINA*; (B) IHQ de la expresión de Sur8 en dos pacientes de SCC representativos de los 14 analizados. En las imágenes se muestra la expresión en zonas de epidermis en comparación con secciones de los SCC de los mismos pacientes. La detección se realizó con  $\alpha$ -Sur8 y las células con marcaje positivo aparecen en color marrón. Las áreas aumentadas de tamaño se indican en un recuadro negro.



# DISCUSIÓN





Durante esta tesis doctoral, hemos querido profundizar en la función y en el papel fisiológico de Sur8, proteína andamio de la vía de activación de ERK. Para ello, hemos utilizado aproximaciones bioquímicas y moleculares en diferentes líneas celulares *in vitro*, junto al análisis *in vivo* de ratones modificados genéticamente generados en el laboratorio y muestras de pacientes con enfermedades epiteliales.

## 1. SUR8 ES NECESARIO PARA MANTENER LA FOSFORILACIÓN DE ERK INDUCIDA POR FACTORES DE CRECIMIENTO Y PARA REGULAR PROCESOS DE ADHERENCIA, PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN

Trabajos anteriores a esta tesis doctoral (Li *et al.*, 2000; Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006; Yoshiki *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2013) ya muestran la necesidad de la presencia de Sur8 para la activación de ERK tras la estimulación con factores de crecimiento. Nuestros resultados, en concordancia con estos artículos, muestran como la reducción de la cantidad de Sur8 endógeno en células HEK 293T y HeLa mediante el uso de siRNAs específicos, reduce drásticamente la fosforilación de ERK inducida por diferentes concentraciones de estímulos como EGF (Fig. R-1). Estos datos sugieren que el incorrecto funcionamiento de Sur8 podría poner en compromiso importantes procesos celulares en los que está implicada la vía RAS/RAF/MEK/ERK (Zhang and Liu, 2002; Yamamoto *et al.*, 2006). Sin embargo, la función adaptadora de Sur8 en contextos concretos o funciones celulares específicas, siguen siendo aspectos poco estudiados. Por ello, en este trabajo, hemos profundizado en el papel que ejerce Sur8 en procesos como la adhesión, proliferación y migración celular.

En el estudio de diferentes propiedades celulares, vemos como la regulación de la adherencia de células HUVEC al sustrato queda comprometida ante la falta de Sur8 (Fig. R-2). Estos resultados apoyan el papel de Sur8 como parte esencial de la comunicación entre las integrinas que median la adhesión celular al sustrato y la vía RAS/RAF/MEK/ERK en respuesta a los estímulos del medio (Huang *et al.*, 2004). Por otro lado, nuestros resultados han demostrado que la viabilidad y proliferación de las células HUVEC también disminuye sin Sur8 (Fig. R-3 y R-4). En la regulación de la división celular y supervivencia de las células endoteliales hay dos vías de señalización claves, ERK y PI3K/AKT, que afectan a la expresión de complejos ciclina/CDK y proteínas de efecto anti-apoptótico (Meloche and Pouyssegur, 2007; Torii *et al.*, 2006). En el ensayo de duplicación celular, un número significativo de células muere tras el silenciamiento de Sur8, sugiriendo que la disminución de la fosforilación de ERK compromete la señal de supervivencia y proliferación celular inducida por diferentes estímulos presentes en

el medio de cultivo. Además, el ensayo *click-it* confirma que la falta de Sur8, y la consecuente bajada de pERK, reduce el número de células en división (Fig. R-4).

Por otra parte, los resultados muestran que la migración de células HeLa en el ensayo de herida queda bloqueada con la pérdida de Sur8, tanto en ayuno como tras estimulación (Fig. R-6 y R-7). Se ha descrito que Sur8, aunque predominantemente citosólico, aparece polarizado en la membrana de las células situadas en el borde de la herida. Además, se ha sugerido que ERK1/2 está implicado en el control de la función del Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC) tanto durante la formación del huso acromático en la división como en las células en interfase (Young *et al.*, 2013). Los autores, muestran como la eliminación de Sur8 y M-RAS inhibe la reorientación del MTOC en células U2OS y la migración directa de HT1080 en cámara y en el ensayo de herida, resultados que van en la misma línea que los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, se ha propuesto que el borde de migración es lugar de activación de ERK y de su sustrato, el complejo WAVE2, cuya fosforilación es necesaria para la estimulación de la protrusión de lamelipodios (Mendoza *et al.*, 2011). Todos estos datos situarían a Sur8 como proteína clave en la coordinación de la vía de ERK con el proceso de migración polarizada inducida por diferentes estímulos. Por otro lado, la diferente morfología que adquieren las células HeLa tras la pérdida de Sur8, podría explicar parte de su incapacidad migratoria (Fig. R-5). De hecho, en fibroblastos embrionarios de ratón se ha demostrado que la pérdida de las proteínas Ras induce importantes alteraciones en estructuras del citoesqueleto, como los microtúbulos y fibras de estrés, provocando un incremento en el número de adhesiones focales junto con un reducida tasa de recambio. Como consecuencia, las células muestran una morfología muy plana y son incapaces de migrar (Drosten *et al.*, 2010).

En el caso de las HUVEC con expresión reducida de Sur8, la alta confluencia y la inducción de la migración por estímulos, provoca su apoptosis (Anexo 1). Se ha sugerido que además de regular el crecimiento y la diferenciación, la interacción entre la célula y la ECM funciona como un factor de supervivencia para muchos tipos celulares, entre los que se encuentran las células endoteliales (Meredith *et al.*, 1993; Scatena *et al.*, 1998). En muchos estudios *in vitro* la apoptosis celular es inducida por eliminación del suero y/o factores de crecimiento (Satake *et al.*, 1998; Villaschi and Nicosia, 1993). En nuestro estudio, la apoptosis ocurre pese a la presencia de diferentes estímulos, lo que sugiere que la presencia de Sur8 es esencial para poder mantener la señal de supervivencia en estas condiciones. Resulta interesante destacar que la vía PI3K/AKT, pero no RAS/RAF/MEK/ERK, se ha visto implicada en la supervivencia celular cuando la apoptosis es inducida por ayuno (Yao and Cooper, 1995; Datta *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997), lo que concuerda con nuestros datos, ya que en

ayuno celular, las células HUVEC sin Sur8 no muestran diferencias con el comportamiento de las células control.

Nuestros experimentos demuestran que Sur8 podría actuar como un integrador de las señales ligadas a adhesión, supervivencia, proliferación y migración, inducidas por una gran variedad de estímulos que señalizan a través de RTKs. Por ello, en condiciones de FS 10%, las consecuencias de la falta de Sur8 son más intensas. Sin embargo, por ahora, no podemos descartar que los efectos observados sean consecuencias indirectas asociadas a funciones independientes de RAS o RAF, o bien de la comunicación con otras vías de señalización como PI3K/AKT o RAL-GDS/Ra1A, implicadas, por ejemplo, en polarización y migración. También, mediante el uso de estímulos como son los mediadores proinflamatorios S1P, regulador del sistema vascular e inmune, o SDF-1, inducido por estímulos proinflamatorios como TNF $\alpha$  o IL-1 y con un importante papel en metástasis, hemos observado una posible función de Sur8 asociada a GPCRs, diferentes de los RTKs con los que siempre se ha relacionado su función. Sur8 podría integrar señales que provienen de distintos tipos de receptores que señalizan a través de RAS. Además, se ha sugerido que la estimulación por receptores GPCRs puede inducir la fosforilación en tirosina de RTKs, como EGFR, lo que provocará la activación de ERK.

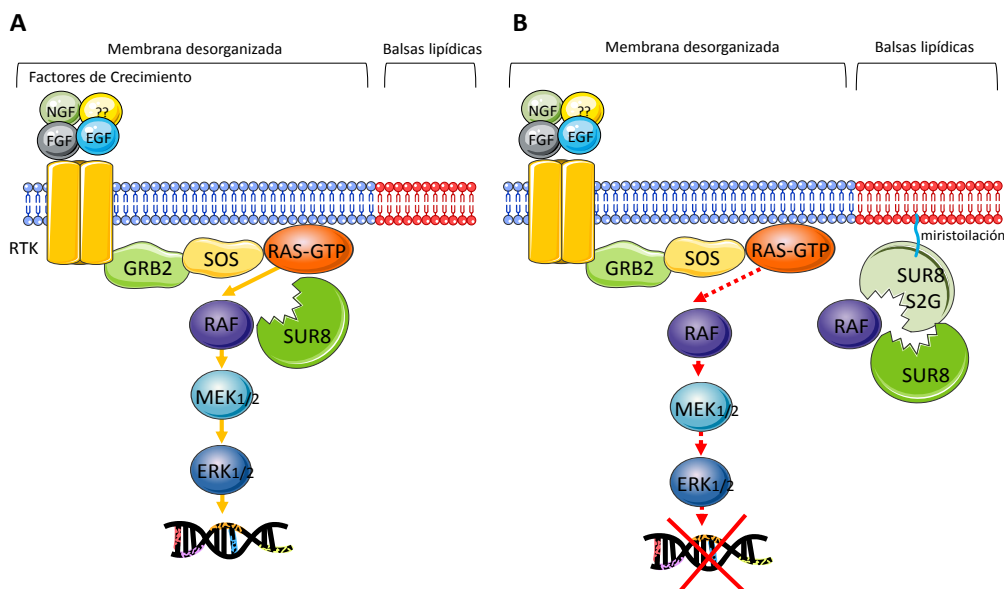
Teniendo en cuenta que M-RAS forma parte de la firma transcripcional de la transición epitelio-mesénquima y que su aumento de expresión correlaciona con un incremento en la invasión y migración (Young *et al.*, 2013), los resultados obtenidos con Sur8 podrían ir en la misma línea, situando a Sur8 como parte del complejo M-RAS/Sur8/PP1c y como proteína implicada en el proceso tumoral, siendo una posible diana antitumoral para bloquear ambos procesos necesarios para la dispersión de las células cancerosas durante la metástasis.

## 2. LA CORRECTA FUNCIÓN ADAPTADORA DE SUR8 DEPENDE DE SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

### 2.1 EL CAMBIO DE LOCALIZACIÓN DEL MUTANTE SUR8 S2G, RESPONSABLE DE UN TIPO DE SÍNDROME DE *NOONAN*, NO POTENCIA LA FOSFORILACIÓN DE ERK COMO SUR8 WT

La primera evidencia de que la proteína adaptadora Sur8 pudiese estar implicada en patologías, fue publicada por el grupo del Dr. Tartaglia (Cordeddu *et al.*, 2009). En este trabajo, describen como una mutación puntual en posición 4 de la secuencia codificante de Sur8 provoca el cambio de una serina por una glicina (S2G) y genera un sitio de miristoilación en posición N-terminal, causante de una variante de síndrome de *Noonan* con pérdida de cabello anágeno. La sobreexpresión de Sur8 S2G, en células Neuro2A, potencia la activación

de ERK de un modo mayor que la proteína wt (Cordeddu *et al.*, 2009). Resultados previos del laboratorio (León, 2010) junto a los resultados expuestos en el apartado 2.1, apuntan, sin embargo, a que el mutante Sur8 S2G no potencia la fosforilación de ERK (Fig. R-8A). Los resultados obtenidos en el ensayo de activación transcripcional, muestran como esta proteína solo aumenta ligeramente la actividad de Gal4-Elk1 tras estimulación (Fig. R-8B). Estos resultados son acordes con los publicados por Galperin y colaboradores (Galperin *et al.*, 2012). Además, hemos comprobado tanto en células HeLa como HEK 293T que Sur8 S2G se encuentra esencialmente en balsas lipídicas de membrana plasmática (Fig. R-10 y R-11). Los resultados obtenidos con Sur8 S2G y, paralelamente con MYR-Sur8, sugieren que ambas proteínas son incapaces de realizar correctamente su función potenciadora desde esta localización, comportándose en realidad como mutantes dominantes negativos. De hecho, datos previos sugieren que Sur8 wt lleva a cabo su función interaccionando con RAS-GTP en zonas de membrana desorganizada (León, 2010), pese a existir también proteínas RAS y RAF en balsas lipídicas (Hancock, 2003; Hekman *et al.*, 2002; Philips, 2005). Sur8 S2G es capaz de interaccionar con RAF y con el propio Sur8 endógeno formando oligómeros (León, 2010), por lo que podíamos plantear la hipótesis de que Sur8 S2G y MYR-Sur8 puedan secuestrar proteínas implicadas en la vía hacia regiones donde no pueden proseguir la cascada de señalización (Fig. D-1).



**FIGURA D-1. INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE ERK POR SUR8 S2G.** (A) Mecanismo de actuación de Sur8 siguiendo el modelo de formación de un triple complejo con RAS y RAF que aumenta la fosforilación de ERK en regiones de membrana desorganizada; (B) Modelo del posible mecanismo por el cual Sur8 S2G no potencia la activación de ERK. Sur8 S2G se encuentra mayoritariamente asociado a regiones de balsas lipídicas, debido a la unión de un grupo miristilo en su secuencia que lo ancla a estas regiones. Tras estimulación por factores de crecimiento, RAS se activa pero no es capaz de activar a RAF eficientemente, ya que la interacción entre ambas no está facilitada por Sur8 S2G. Además, Sur8 S2G es capaz de interaccionar con RAF, desplazándolo hacia regiones alejadas de RAS-GTP, y de oligomerizar con otras moléculas de Sur8, inhibiendo la fosforilación de ERK.

Sin embargo, pese a que Sur8 S2G y MYR-Sur8 se encuentran localizados en la misma región subcelular, no se comportan de la misma manera en la activación de ERK: MYR-Sur8 inhibe la activación de ERK, mientras que Sur8 S2G no la potencia. Estas diferencias pueden deberse a que la secuencia de miristoilación de MYR-Sur8 impida estéricamente la interacción con otras proteínas implicadas en la activación de RAF, provocando un desacoplamiento del complejo y la no fosforilación de ERK. También puede deberse a que la interacción con las balsas lipídicas es más fuerte o estable en MYR-Sur8, ya que la secuencia de Src que lleva fusionada también sufre una palmitoilación, mientras que en Sur8 S2G solo ocurre la miristoilación.

Una de las hipótesis que explicaría las diferencias con los resultados obtenidos para Sur8 S2G por el grupo del Dr. Tartaglia, sería la naturaleza de la línea celular empleada en su trabajo (neuroblastoma). Es posible que el modelo descrito por el grupo del Dr. Rodríguez-Viciano, con el complejo formado por M-RAS/Sur8/PP1c (Rodríguez-Viciano *et al.*, 2006), ocurra predominantemente en cerebro, donde M-RAS se encuentra sobreexpresado, y que la mutación S2G en ese contexto se comporte de manera diferente al modelo RAS/Sur8/RAF en células HEK 293T, Cos7 o HeLa (Li *et al.*, 2000). Sin embargo, nuestros resultados podrían verse apoyados *in vivo* por recientes publicaciones que describen que la delección del gen *SUR8* o una mutación puntal en posición 519 (cambio de la metionina en posición 173 por isoleucina) están relacionadas con la aparición de RASopatías similares a las del síndrome de *Noonan* y otros síndromes cardio-facial-cutáneos (Chen *et al.*, 2014; Hanning *et al.*, 2014). El mutante G519A, por ejemplo, no interacciona eficientemente con PP1c, dando lugar a una insuficiente activación de C-RAF. Además, esta variante es incapaz de rescatar totalmente la actividad de ERK1/2 en células en las que se ha eliminado la proteína Sur8 endógena (Hanning *et al.*, 2014).

El avance en el conocimiento sobre el comportamiento molecular de Sur8 S2G en RASopatías, podría ser útil para plantear nuevos tratamientos. Además, estudiar el potencial efecto terapéutico de la proteína MYR-Sur8 para el bloqueo de la activación constitutiva de ERK en tumores, inducidos por mutaciones en RAS o RTKs, podría ayudar a disminuir sus características tumorales. Como vemos en la Figura R-9 y en Kaplan *et al.*, 2012, esta opción podría ser factible, ya que la sobreexpresión tanto de Sur8 S2G como de MYR-Sur8, reduce la fosforilación de ERK inducida por RAS hiperactivo. Además, las consecuencias biológicas de la sobreexpresión de MYR-Sur8 incluyen la reducción significativa del número de focos transformantes generados por RAS hiperactivo y la inhibición de la neuritogénesis inducida por NGF en células PC12 (León, 2010).

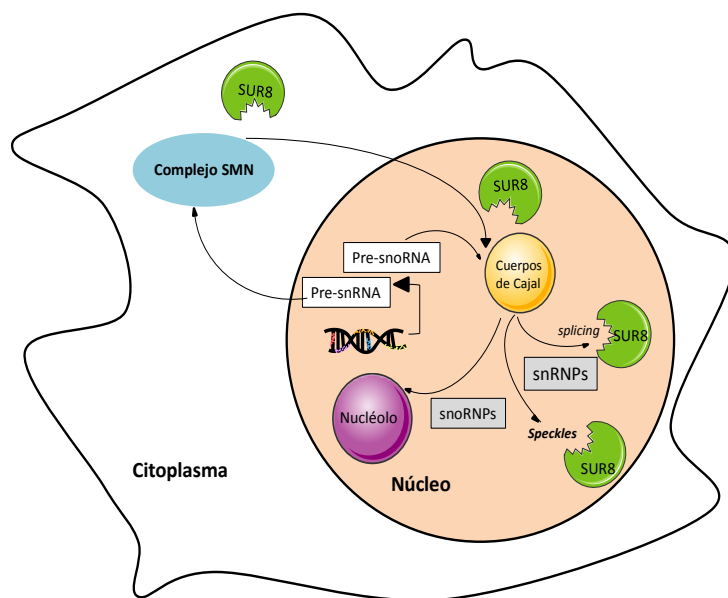
## 2.2 SUR8 EN EL NÚCLEO CELULAR PODRÍA DESEMPEÑAR FUNCIONES RELACIONADAS CON LA TRANSCRIPCIÓN Y EL PROCESADO DEL MRNA

Los resultados mostrados en las Figuras R-12 y 13, sugieren que Sur8 también se localiza en regiones nucleares, coincidente con resultados de otras publicaciones (Cordeddu *et al.*, 2009; Jeoung *et al.*, 2013). Recientemente, se ha definido a la región N-terminal de Sur8 como la responsable de su localización en el núcleo antes y después de la estimulación con EGF (Jeoung *et al.*, 2013). Estos resultados, concuerdan con la zona definida *in silico* con posibles NLS monopartitas o bipartitas en Sur8 (Fig. R-14). La comprobación, mediante el ensayo de separación núcleo/citoplasma, de que un mutante de delección de los primeros 88 aminoácidos de Sur8 no es capaz de dirigirse al núcleo celular, va en esta misma línea. Actualmente, estamos generando mutantes puntuales de estas putativas NLS para corroborar que no sea el cambio conformacional producido por la delección de un fragmento tan extenso, el verdadero responsable de no localizarse en núcleo.

Por otro lado, hemos definido algunas NES como responsables de la exportación de Sur8 al citoplasma (aunque hay que tener en cuenta que las NES consenso con las que se trabaja solo representan el 36% de secuencias empleadas por estas proteínas) (Fig. R-15). Los ensayos con leptomicina B muestran como la inhibición del exportador CRM1, provoca una ligera acumulación de Sur8 en núcleo y región perinuclear, tanto en células HeLa como NIH3T3 (Fig. R-26), sugiriendo que la fracción de Sur8 requerida de vuelta en citoplasma podría estar ligada al complejo heterotrimérico de CRM1 formado con Ran-GTP y la proteína a transportar o acoplada a otras moléculas que se vean afectadas por la leptomicina. El hecho de que no se produzca su acumulación en núcleo, como ocurre con proteínas como p65 (Anexo 4), puede deberse a que utilice además otros transportadores diferentes a CRM1 o a que se produzca su degradación en el núcleo por el proteasoma para ajustar sus niveles nucleares (Moon *et al.*, 2011). Apoyando esta idea, sabemos que Sur8 colocaliza con el proteasoma dentro del núcleo (datos no mostrados) y además se ha identificado a HUWE1 como ubiquitin ligasa que media la ubiquitinización de Sur8, lo que podría estar relacionado con el paso previo a su degradación (Jang *et al.*, 2014).

En cuanto a su distribución en el interior del núcleo, mediante ensayos de colocalización, vemos que Sur8 presenta el mismo patrón de localización que un marcador específico de *speckles* (Fig. R-17), lo que sugiere una función de Sur8 relacionada con la transcripción o el *splicing*, por ser zonas de acumulación de factores relacionados con estos procesos. Estas posibles funciones son acordes a los resultados obtenidos en los análisis proteómicos realizados con extractos nucleares inmunoprecipitados de células HEK 293T o RT112 FGFR1 (Anexos 6 y 7),

aunque comparamos tipos celulares muy diferentes y con niveles de expresión de Sur8 también muy distintos. En cuanto a su función en el *splicing*, Sur8 podría ser un elemento necesario en el ciclo de síntesis y maduración de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) y ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs), ya que se encuentra en muchas de las localizaciones implicadas en este proceso (como los Gems, relacionados con los Cuerpos de Cajal. Datos no mostrados) e interacciona con muchas proteínas implicadas (complejo U2: SF3B4, SF3B3; complejo U4/U6: PRP4, PRP31) (Fig. D-2). Por otro lado, en los *speckles* nucleares, donde se acumulan los snRNPs maduros, se encuentran fosfatasa que también están implicadas en el ensamblaje de los snRNPs como PP2A, que interacciona con Sur8 en estos ensayos, y PP1, con la que también interacciona Sur8 en diferentes trabajos (Rodríguez-Viciano *et al.*, 2006; Moorhead *et al.*, 2007). El hecho de tratarse de una proteína adaptadora/andamio, podría hacer que Sur8 sea relativamente promiscua a interaccionar con múltiples complejos.



**FIGURA D-2. BIOGÉNESIS DE LOS SNRNPs/SNORNPS.** Tras su transcripción, los snRNAs se exportan a través de CRM1. En el citoplasma, los snRNAs formarán un complejo con varias proteínas que es reconocido por la snurportin1, siendo transportados al núcleo vía importina  $\beta$ . En el núcleo, inicialmente se movilizan a los Cuerpos de Cajal donde terminarán su maduración. Los snRNPs maduros se acumulan en los *speckles* o se dirigen a sitios activos de transcripción para el *splicing*. Los snoRNPs en el nucléolo participan en la modificación del rRNA y ensamblaje de ribosomas. Se indican los puntos del ciclo en los que podría participar Sur8.

### 3. LA DELECCIÓN DE SUR8 EN LA EPIDERMIS MURINA PROVOCA ALTERACIONES EN LOS FOLÍCULOS PILOSOS, HIPERPLASIA EPIDÉRMICA, INFLAMACIÓN Y ANORMALIDADES OCULARES

En los resultados descritos en el apartado 4 de esta tesis doctoral, hemos mostrado como la delección de Sur8 dirigida por el promotor K5, específico de la capa basal de la epidermis y la ORS del folículo piloso, induce alteraciones en el desarrollo del folículo y en su ciclo vital, en la epidermis interfolicular, en los ojos y en el estatus inflamatorio de los ratones, acompañado de un reducido tamaño corporal.

### 3.1 EL KO DE SUR8 EN EPIDERMIS PRESENTA PELO RIZADO QUE DEGENERAR PROGRESIVAMENTE

Los ratones  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  son fácilmente distinguibles entre la primera y segunda semana de vida postnatal debido a la pronunciada ondulación de las vibrisas (aparentes a los 2 días de edad) y el pelo corporal (Fig. R-29A). Este mismo fenotipo, denominado *waved*, fue descrito anteriormente asociado a un descenso en la actividad de la vía de señalización de EGFR (Schneider *et al.*, 2008): el animal *waved-1* es un mutante nulo para el ligando TGF $\alpha$ , y el ratón *waved-2* posee una mutación puntual en el sitio de unión a ATP en el dominio tirosina quinasa del gen *Egfr* (sustitución de glicina por valina en posición 743) (Mann *et al.*, 1993; Luetkeke *et al.*, 1993; Luetkeke *et al.*, 1994). Sin embargo, las alteraciones capilares observadas en los mutantes *waved* desaparecen progresivamente con los sucesivos ciclos del pelo (a partir de las 7-8 semanas de vida), aunque las vibrisas permanecen curvadas el resto de vida de los animales. Este fenotipo del pelo ondulado, consecuencia de la disminución de la señalización por EGFR, se ha relacionado con una interacción errónea entre la ORS e IRS del folículo, necesaria para una correcta proliferación y migración celular durante la elongación del pelo. El ligando TGF $\alpha$  (presente en IRS) y EGFR (expresado en ORS a partir del 5 día postnatal) coordinan este proceso, por lo que las disrupciones provocadas por una señalización errónea del EGFR, puede producir pelos con calibre irregular y una deposición celular incorrecta, o puede que también altere la queratinización en el folículo o en el eje del pelo (Doma *et al.*, 2013). En consonancia, en la Figura R-29B vemos como los pelos de los animales KO contienen regiones de septulación y calibre irregular.

En el caso del animal  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ , a partir de las 3 semanas aproximadamente, el pelo rizado degenera progresivamente apareciendo zonas de alopecia, más marcadas en la región dorsal (Fig. R-30). La expresión de un dominante negativo de EGFR bajo control del promotor K5 (K5-HERCD-533), dio lugar a animales cuyo fenotipo es muy similar al obtenido en nuestros ratones: los transgénicos presentan vibrisas rizadas y su primer pelaje también presenta apariencia ondulada. Sin embargo, al igual que en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ , el pelo sufre un proceso degenerativo volviéndose gradualmente más escaso y disperso tras varios meses, finalmente dando lugar a una severa alopecia (Murillas *et al.*, 1995). Este mismo fenotipo fue observado en algunas cepas KO para EGFR, capaces de sobrevivir unas pocas semanas con graves anormalidades en la piel (Miettinen *et al.*, 1995; Sibila and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995), así como en el doble KO B-RAF/C-RAF (Galabova-Kovacs *et al.*, 2008). Aunque todavía no hemos profundizado en el mecanismo molecular que lleva a esta pérdida capilar progresiva en los KO para Sur8 en epidermis, las conclusiones de los artículos relacionados sugieren que los folículos fallan en la entrada en catagén y quedan en una aberrante fase de anagén, dando lugar a la progresiva pérdida de pelo e inflamación,



demostrando que la activación de EGFR es necesaria para la progresión en el ciclo del pelo. Sin embargo, su activación continuada también da lugar a pérdida de pelo, apoyando la teoría de la necesidad de que exista un proceso cíclico *switch on/off* de esta vía como requerimiento para la correcta progresión entre las fases del ciclo del pelo (Doma *et al.*, 2013; Mak and Chan, 2003).

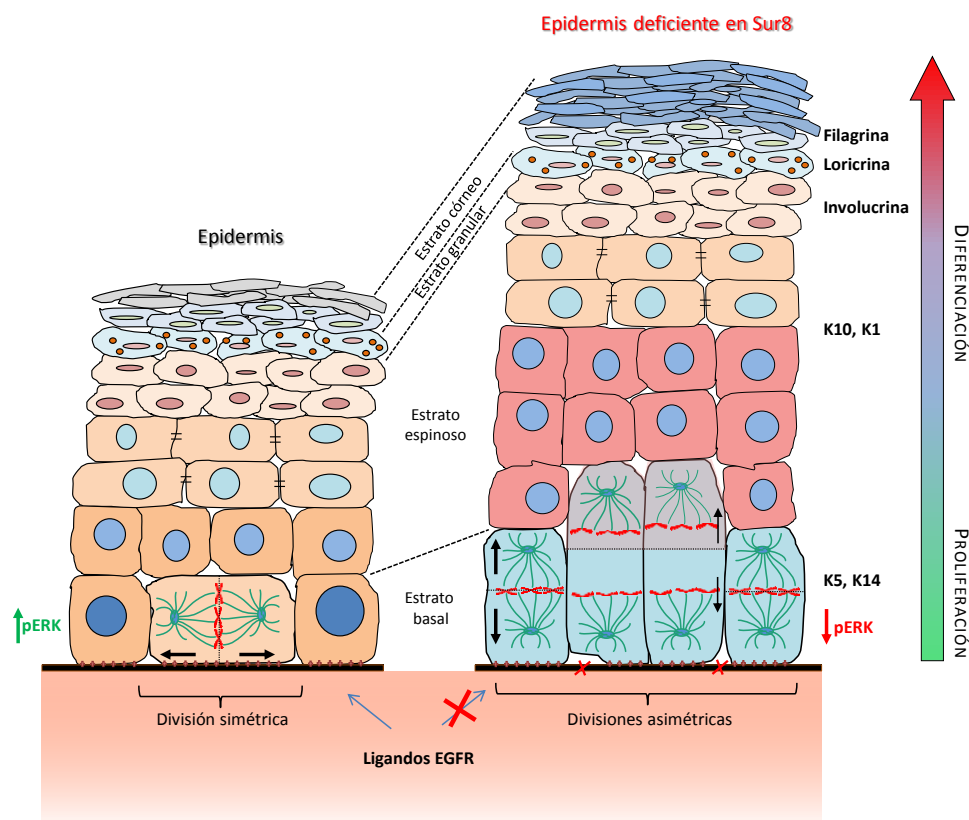
El fenotipo intermedio observado en los mutantes *waved* y en ratones KO heterocigotos para EGFR (Miettinen *et al.*, 1995; Sibila and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995), comparado con las alteraciones encontradas en el ratón KO de Sur8 en epidermis y en el ratón K5-HERCD-533 (Murillas *et al.*, 1995), sugiere que en el Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> se está produciendo una severa inhibición de la cascada de la señalización EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK, tal y como muestran los reducidos niveles de pERK obtenidos del análisis de los queratinocitos de estos animales (Fig. R-26C y R-34). La eliminación de Sur8, bloquearía cualquier compensación mediada por otros receptores EGFR o HER2/neu, también presentes en la capa basal de la epidermis. Sin embargo, en los ratones *waved* tiene lugar, probablemente, una inhibición parcial de la señalización mediada por EGFR ya que, en el caso del *waved-1* existen otras moléculas que pueden compensar la falta de TGF $\alpha$  (como EGF, el factor de crecimiento ligado a heparina, betacelulina o anfiregulina), mientras que en el mutante *waved-2*, la mutación puntual en EGFR produce solo una ligera inhibición de la fosforilación de EGFR *in vivo*, tal como ocurre en los KO heterocigotos para EGFR.

En conjunto, estos resultados indican que los folículos pilosos reaccionan de forma muy sensible a la modulación de la vía EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK, por lo que Sur8 es un elemento esencial para mantener los niveles de fosforilación de ERK, y así evitar perturbaciones en la actividad de esta cascada que afecten a la progresión del ciclo del pelo.

### 3.2 HIPERPLASIA EPIDÉRMICA EN LOS ANIMALES DEFICIENTES EN SUR8

La señalización a través de EGFR es considerada como inductora de una respuesta mitogénica en los queratinocitos epidérmicos. De hecho, se ha descrito que la delección de *H-*, *K-* y *N-Ras* resulta en una parada de la proliferación de queratinocitos *in vitro* (quedando acumulados en G1 con entrada concomitante en senescencia), con inducción de la expresión de *p15* y/o *p21*, bajada de *c-Myc* y  $\Delta Np63$  y un aumento en la expresión de *K10* (Drosten *et al.*, 2014). En consonancia con estos datos, los resultados obtenidos con queratinocitos primarios KO para Sur8 *in vitro*, muestran una elevada expresión de inhibidores del ciclo celular (*p16*, *p19* o *p53*) y una disminución de marcadores de proliferación (*ciclina D1/D2* y *PCNA*), acompañado de un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación (*K1*, *K10*,

*Involucrina*) (Fig. R-23 y R-24). Sin embargo, la eliminación de Sur8 *in vivo* y la consecuente inhibición de la fosforilación de ERK, no impide un aumento de proliferación de las células basales de la epidermis, como muestra el marcaje de KI67 y EdU en los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup> (Fig. R-32). La disminución de la fosforilación de ERK, podría resultar en una señal necesaria para la estimulación de la división asimétrica de las células troncales de la capa basal durante el proceso de estratificación de la epidermis (Lechler and Fuchs, 2005). Esta hipótesis iría en consonancia con nuestros resultados, ya que las células hiperplásicas expresan el marcador de diferenciación temprana K10 característico de células suprabasales, dando lugar a una diferenciación defectuosa (Fig. R-33). Este fenotipo encontrado en los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>, también aparece en el animal K5-HERCD-533, donde la epidermis interfolicular es marcadamente hiperplásica, con expresión de K6 (asociada a hiperproliferación) y un ratio de proliferación 9 veces mayor que la de los animales control (Murillas *et al.*, 1995). En los animales KO para EGFR, también existe hiperplasia de células suprabasales positivas para el marcador de diferenciación temprana K1 (Miettinen *et al.*, 1995).



**FIGURA D-3. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE SUR8 EN LA EPIDERMIS INTERFOLICULAR.** La vía RAS/RAF/MEK/ERK se encuentra normalmente activada en las células troncales de la capa basal para mantener su capacidad proliferativa. En este modelo, la pérdida de Sur8 podría provocar la disminución de ERK fosforilado en estas células por una incorrecta señalización vía integrinas o a través de ligandos para RTKs del medio, favoreciendo la diferenciación de los progenitores y expandiendo el compartimento de células suprabasales que expresan marcadores de diferenciación temprana.

Otra hipótesis para explicar la hiperplasia en la epidermis de los animales KO para Sur8 sería la proliferación inducida por acción de estímulos mitogénicos sobre los queratinocitos basales, por ejemplo las citoquinas liberadas por las células inflamatorias infiltradas (S100A8 y S100A9), no dependientes de la función de la vía de ERK (Lee *et al.*, 2012). Tampoco descartamos que también pueda deberse a un incremento de la acción de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) o FGF, que en este contexto, señalizasen por vías independientes de RAS (como PKC, smads/TGFbeta...) y que, por tanto, no dependan de la función de Sur8. En línea con esta hipótesis, los resultados obtenidos con los queratinocitos aislados de los animales KO para Sur8, muestran un aumento en la fosforilación basal de AKT, en comparación con los animales control (Fig. R-27), lo que podría dar lugar a fenotipos asociados a una sobreactivación de esta vía en la epidermis de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>.

### 3.3 EL ANIMAL KO DE SUR8 EN EPIDERMIS PRESENTA UNA INFLAMACIÓN GENERALIZADA

Nuestro estudio demuestra que la presencia de Sur8 en la epidermis es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de la piel y el organismo ya que, en su ausencia, los animales muestran un característico fenotipo de inflamación cutánea que se extiende a otros órganos corporales como ganglios cervicales, bazo y ganglios mesentéricos (Fig. R-36). En los animales K5-HERCD-533 ocurre este mismo efecto y en el animal EGFR<sup>Δep</sup> también se produce la inflamación de la piel (inducida por quimioquinas), en los primeros días tras el nacimiento. El infiltrado inflamatorio temprano en la piel de los EGFR<sup>Δep</sup> es dominado por células dendríticas, macrófagos, granulocitos, células mastoides y células T (Murillas *et al.*, 1995; Lichtenberger *et al.*, 2013). El potente efecto inflamatorio generado en los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>, que provoca su sacrificio alrededor de los 5 meses de edad, podría ser efecto indirecto de la degeneración y necrosis de los folículos epidérmicos. Sin embargo, el análisis por citometría de las poblaciones celulares que componen los órganos afectados en estos animales, sugiere un efecto directo de la eliminación de Sur8 (datos no mostrados). En concordancia, en el trabajo de Lichtenberger y colaboradores, el cruce de los ratones EGFR<sup>Δep</sup> con animales en un fondo *hairless*, no rescata el fenotipo inflamatorio, sugiriendo que se trata de un efecto directo de la inhibición de la activación de ERK en algún órgano en el que K5-Cre también se expresa (Lichtenberger *et al.*, 2013). Aunque no existe un registro de la actividad recombinasa de la Cre en diferentes tejidos, dirigida por esta secuencia concreta del promotor de la K5, existen una gran variedad de artículos que describen fenotipos relacionados con el sistema inmune empleando este modelo transgénico. No obstante, el promotor K5 endógeno sí se expresa en

células del timo, lo que podría explicar el fenotipo de regresión tímica por apoptosis generalizada encontrada en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$  (Anexo 8) (Byrne and Fuchs, 1993).

Estos efectos tras la pérdida de Sur8 en epidermis, son contrarios a los obtenidos en queratinocitos infectados *in vitro* con adeno-Cre, en los que vemos que algunos de los genes que controlan la inflamación (*TNF- $\alpha$* , *S100A9*) están menos expresados en los queratinocitos KO para Sur8, sugiriendo un papel proinflamatorio de Sur8 *in vitro* (Fig. R-25). Sin embargo, los efectos secundarios observados en pacientes de cáncer epitelial metastásico tratados con anticuerpos monoclonales contra EGFR (*Cetuximab*, *Panitumumab*) o moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa del EGFR (*Gefitinib*, *Erlotinib*), recuerdan a los fenotipos observados en los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ . Frecuentemente, los pacientes presentan toxicidad de la piel entre los primeros días y semanas de la terapia: inflamación cutánea (erupción, sarpullido), infecciones bacterianas cutáneas por una deficiente función barrera de la piel, y apariencia ondulada del cuero cabelludo con degeneración de los folículos pilosos, asociado a un descenso en los niveles de pEGFR y pERK (Pastore *et al.*, 2005).

### 3.4 EL KO DE SUR8 EN EPIDERMIS PRESENTA CRECIMIENTO REDUCIDO Y ANORMALIDADES OCULARES

Los animales  $Sur8^{flox/flox};K5-Cre^{T/+}$ , son considerablemente más pequeños que sus hermanos de camada y que los animales heterocigotos (Fig. R-28). Esta observación podría ser un efecto indirecto de la pérdida de Sur8 en epidermis y/o de la inhibición de la vía de ERK, o de la malformación en el labio inferior (con la ulceración asociada al hocico), que les impida comer adecuadamente. Otra hipótesis iría en relación con la expresión de K5 descrita en el estómago, esófago o lengua, por lo que la pérdida de Sur8 en estos órganos podría influir directamente en el tamaño de los animales (Byrne and Fuchs, 1993). Los otros mutantes señalados, *waved-1*, *HERCD-533* y  $EGFR^{\Delta ep}$ , presentan también un fenotipo similar de menor tamaño (Mann *et al.*, 1993; Luetke *et al.*, 1993; Murillas *et al.*, 1995; Lichtenberger *et al.*, 2013).

Adicionalmente, los animales KO presentan anomalías oculares que pueden deberse a fallos en la fusión prenatal de los párpados, ya que estos animales presentan los ojos abiertos al nacer (Fig. R-37) (Bennett and Gresham, 1956). Aunque como ya hemos comentado no existe un registro concreto de la actividad recombinasa del animal transgénico  $K5-Cre$  generado por Tarutani y colaboradores (Tarutani *et al.*, 1997), sí que existen datos que demuestran la expresión del promotor endógeno K5 en la córnea del ojo (Byrne and Fuchs, 1993). Aunque la queratitis y la microftalmia son patologías relativamente frecuentes en la cepa murina C57, el número de animales afectados por genotipo es concluyente. La variabilidad en el grado de afectación y en la incidencia de las anomalías oculares, sugieren que pueden estar ocurriendo patologías secundarias añadidas como daño físico o

infección, que contribuyan finalmente a la formación de úlceras de la córnea con la contracción asociada a la perforación del globo. Del mismo modo, algunos de los animales *waved-1* y *-2*, los que expresan el dominante negativo HERCD-533 y los EGFR<sup>Δep</sup>, presentan párpados abiertos al nacer y un mal desarrollo ocular, que deriva también en opacidad corneal con la edad (Mann *et al.*, 1993; Luetke *et al.*, 1993; Murillas *et al.*, 1995; Lichtenberger *et al.*, 2013).

#### 4. INFLUENCIA DE LA FUNCIÓN DE SUR8 EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL ORGANISMO ADULTO

Debido a que Sur8 es esencial en el desarrollo embrionario (Yi *et al.*, 2010), el efecto de su delección después de la embriogénesis no se ha estudiado anteriormente. En esta tesis doctoral, hemos demostrado que la delección de Sur8 en animales adultos, induce una aparición acelerada de una serie de fenotipos relacionados con envejecimiento que podrían ir ligados a la reducción del número de células troncales y progenitoras y/o el agotamiento de la capacidad de renovación tisular para el mantenimiento de la homeostasis del organismo (López-Otín *et al.*, 2013).

Uno de los fenotipos más característicos de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup> es el enanecimiento generalizado (Fig. R-40A). Esta alteración, asociada a con los melanocitos intercalados en los folículos, se ha relacionado con la señalización vía B-RAF y C-RAF como factor necesario para el mantenimiento de la capacidad *stem* de los melanocitos en su nicho, siendo dispensables durante el desarrollo temprano del linaje melanocítico (Nishimura *et al.*, 2005; Valluet *et al.*, 2012). En estos trabajos se sugiere que la pérdida progresiva de los melanocitos troncales en el *bulge* no parece estar asociado a una diferenciación prematura de estas células aunque sí parece verse afectada la entrada en la fase S del ciclo celular en los animales KO para B-RAF y C-RAF, sugiriendo que la señalización por ERK puede controlar directamente la división asimétrica de los melanocitos troncales durante el anagén folicular (Valluet *et al.*, 2012).

Entre otros fenotipos, destacan los defectos neuromusculares que conllevan falta de coordinación, temblores y fallo en el reflejo plantar durante el test TST (Fig. R-41A). A lo largo del desarrollo neural, está bien establecido que la vía RAS/RAF/MEK/ERK juega un papel muy importante en la regulación tanto de la proliferación como de la diferenciación de células neurales, dependiendo de la intensidad y duración de la señal, por lo que la cinética de activación de ERK es crucial en la determinación del destino neuronal (Fukuda *et al.*, 1995; Ebisuya *et al.*, 2005). En esta línea, nuestro grupo ha demostrado recientemente la importancia de Sur8 como modulador esencial de la vía de ERK para regular la proliferación y

diferenciación *in vitro* de la línea celular PC12, empleada como modelo de neuronas simpáticas y que responde de forma reversible a NGF (León *et al.*, 2014). También se ha publicado un trabajo en el que se muestra como Sur8 está reprimido durante la diferenciación de los progenitores neurales *in vitro* y en el cerebro en desarrollo de embriones de rata. Además, sugieren que Sur8, a través de la modulación de la vía de ERK, es un potencial factor intracelular para el mantenimiento de la multipotencia y la capacidad de autorenovación de células madre neurales, y potencialmente de otras células troncales como las endoteliales o mesenquimales (Moon *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro modelo, la eliminación de Sur8 está inducida en animales recién destetados por lo que podría afectar solamente a los nichos de células madre neurales en adulto (zona subventricular e hipocampo). En este sentido, se ha descrito un papel esencial de B-RAF en la maduración de los oligodendrocitos y en la mielinización durante el desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Central. Ratones KO para B-RAF bajo control de la recombinasa Cre con el promotor Nestina (Nestin-Cre, expresado en células madre neurales), muestran una severa desmielinización, diferenciación errónea de los oligodendrocitos y disminución de la activación de ERK en el cerebro (Galabova-Kovacs *et al.*, 2006). La descripción de que tanto M-RAS como Sur8 se encuentran mayoritariamente en cerebro (Kimmelman *et al.*, 1997; Selfors *et al.*, 1998) podría sugerir una función importante de Sur8 en este órgano y relacionarla, además, con algunas enfermedades neurodegenerativas.

Una posible consecuencia de los daños neuronales producidos por la falta de Sur8 podría ser la presencia de una disfunción en la vejiga, como vemos en algunos animales que han fallecido. Este fenotipo podría estar relacionado con la llamada vejiga neurogénica, que asocia esta disfunción con un trastorno o lesión neurológica. Sin embargo, esta disfunción también puede deberse a enfermedades como la diabetes mellitus, por lo que no podemos descartar que el aumento de peso en los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup> esté relacionado, a su vez, con esta patología (Fig. R-41B). En esta misma línea, se ha descrito que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) está selectivamente incrementada en el tejido adiposo de ratones obesos y que este aumento de estrés oxidativo en el tejido graso es un mecanismo clave en la aparición de la resistencia a insulina relacionada con la obesidad, afectando al metabolismo de la glucosa en otros órganos como el músculo o las células  $\beta$  del páncreas. Además, el incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias por el tejido adiposo contribuye a esta resistencia a insulina (Furukawa *et al.*, 2004).

El análisis en profundidad de los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;UBC-Cre<sup>ERT2 T/+</sup>, irá en la dirección de verificar el estado de los nichos de células troncales presentes en los diferentes tejidos adultos. Es esperable que los tejidos de alta renovación o los órganos particularmente vulnerables a

perturbaciones en la actividad RAS/RAF/MEK/ERK sean los más afectados, aunque es posible que en determinados sistemas no haya fenotipos aparentes por la compensación con otras moléculas u otros sistemas ligando/receptor. Por otro lado, habría que tener en cuenta que Sur8, por lo descrito anteriormente, podría tener funciones más allá de la vía de ERK, como las relacionadas con su función en el núcleo celular, por lo que quizás no todos los fenotipos encontrados en estos animales podrían explicarse a través de la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK.

## 5. EXPRESIÓN DE SUR8 EN MUESTRAS HUMANAS DE SCC Y PSORIASIS

En humanos las enfermedades epiteliales tienen una elevada incidencia en la población, afectando al 30%-70% de los individuos, y englobando una gran variedad de patologías entre las que se encuentra la psoriasis y el cáncer de piel no-melanoma (Hay *et al.*, 2010). La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que produce lesiones escamosas. Aunque existe una amplia variabilidad clínica y evolutiva, es común la hiperplasia epidérmica por un aumento de la población germinativa, y el infiltrado inflamatorio de la dermis. La inflamación viene mediada por linfocitos T CD4+ y los queratinocitos, que liberan citoquinas que estimulan la proliferación de las células epidérmicas (Griffiths and Barker, 2007). Por otro lado, el SCC y el carcinoma de células basales (BCC) suponen el 20-25% de los tumores malignos cutáneos, siendo los tumores más frecuentes tras el melanoma. El SCC, a diferencia del BCC, es altamente metastásico, y se desarrolla a partir de las células del estrato espinoso de la epidermis, pero también de las células escamosas que se encuentran en el recubrimiento de órganos como el aparato respiratorio y digestivo.

El cambio de localización subcelular de Sur8 que tiene lugar tanto en las muestras humanas de pacientes con psoriasis como con BCC, sugiere, tal y como planteamos en esta tesis doctoral, que Sur8 podría desempeñar distintas funciones según se halle en un lugar u otro de la célula (Fig. R-42 y R-43). Su presencia en membrana plasmática puede estar ligada a la formación de la capa córnea y su presencia en algunos núcleos de células de la capa basal puede ir ligada a sus funciones relacionadas con transcripción, procesamiento del RNA, ciclo celular, etc. La observación de que las formas fosforiladas de varias MAPK como ERK1/2, p38 y JNK se encuentran elevadas en las placas psoriáticas relaciona estas proteínas, y sus cascadas de activación, con la patofisiología de la psoriasis (Johansen *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2005). Del mismo modo, las mutaciones activantes de RAS son muy frecuentes en los SCC, lo que podría favorecer la localización de Sur8 en el citoplasma para llevar a cabo su función como regulador positivo de la activación de RAF.





# CONCLUSIONES

# CONCLUSIONS



Las principales conclusiones extraídas de esta Tesis se resumen a continuación:

1. La supresión de Sur8 bloquea la transmisión de la señal inducida por factores de crecimiento como EGF o VEGF, provocando la alteración de los procesos de adhesión, disminuyendo la proliferación y afectando a la viabilidad de células HUVEC, junto con el bloqueo de la migración en células HeLa.
2. La localización del mutante Sur8 S2G (responsable de un tipo de síndrome de *Noonan* con cabello anágeno suelto) en regiones de balsas lipídicas de membrana plasmática, no es capaz de potenciar la activación de ERK dependiente de la estimulación por factores de crecimiento como el EGF o FGF.
3. La presencia de Sur8 en el núcleo celular está relacionada con una posible función en transcripción y procesamiento del pre-mRNA.
4. La deficiencia de Sur8 en queratinocitos murinos *in vitro* provoca el descenso de marcadores relacionados con proliferación, simultáneamente a un aumento en marcadores de diferenciación celular. Los efectos derivados de la supresión de Sur8 *in vivo* en epidermis parecen relacionarse con una pérdida de la activación de ERK y resultan en alteraciones en el ciclo del pelo dando lugar a alopecia, hiperplasia de la epidermis con aumento de la expresión de K10, defectos oculares, reducción del tamaño de los animales y una inflamación generalizada que ocasiona su muerte alrededor de los 6 meses de edad.
5. Sur8 en el organismo adulto es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y su regeneración, provocando su pérdida la aparición de fenotipos relacionados con envejecimiento como el encanecimiento y progresiva pérdida del pelo, aumento de peso o defectos neuromusculares.
6. La expresión de Sur8 en muestras de pacientes de psoriasis y SCC indica un cambio en la localización subcelular de esta proteína hacia citoplasma en las células afectadas, reflejando las posibles funciones de esta proteína reguladora en determinados contextos.



The main conclusions of this thesis are summarized below:

1. Sur8 knockdown blocks the signal transmission induced by growth factors such as EGF or VEGF, resulting in impaired adhesion processes, reducing proliferation and affecting viability in HUVEC cells, along with blocked migration in HeLa cells.
2. The location of Sur8 S2G mutant (responsible for a type of Noonan syndrome with loose anagen hair) in lipid rafts regions of the plasma membrane, is not able to enhance the activation of ERK in spite of the stimulation by growth factors such as EGF or FGF.
3. The presence of Sur8 in the cell nucleus is related to a possible role in transcription and pre-mRNA processing.
4. Sur8 deficiency in murine keratinocytes *in vitro* causes lowering of proliferation-related markers simultaneously leading to an increase in cell differentiation markers. The effects of the suppression of Sur8 *in vivo* in epidermis seem to relate to a loss of ERK activation and result in hair cycle alterations leading to alopecia, hyperplasia of the epidermis with increased expression of K10, eye defects, limiting the size of the animals and widespread inflammation that causes its death after around 6 months.
5. Sur8 is essential in the adult organism for the maintenance of tissue homeostasis and regeneration, causing its suppression the appearance of aging related phenotypes as graying and progressive hair loss, weight gain or neuromuscular defects.
6. Sur8 expression in patient samples of psoriasis and SCC shows a different subcellular location of this protein to cytoplasm in the affected cells, reflecting the different roles of this regulatory protein in certain contexts.



# BIBLIOGRAFÍA





Adjei, A.A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93, 1062-1074.

Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* 13, 1610-1619.

Aljanabi, S.M. and Martínez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25, 4692-4693.

Arozarena, I., Calvo, F., and Crespo, P. (2011). Ras, an actor on many stages: posttranslational modifications, localization, and site-specified events. *Genes Cancer* 2, 182-194.

Arozarena, I., Matallanas, D., Berciano, M.T., Sanz-Moreno, V., Calvo, F., Muñoz, M.T., Egea, G., Lafarga, M., and Crespo, P. (2004). Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol* 24, 1516-1530.

Barnier, J.V., Papin, C., Eychène, A., Lecoq, O., and Calothy, G. (1995). The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 270, 23381-23389.

Bennett, J.H. and Gresham, G.A. (1956). A gene for eyelids open at birth in the house mouse. *Nature* 178, 272-273

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 207–217.

Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (2005). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54, 402-411.

Byrne, C. and Fuchs, E. (1993). Probing keratinocyte and differentiation specificity of the human K5 promoter in vitro and in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 13, 3176–3190.

Byrne, C., Tainsky, M., and Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120, 2369–2383.

Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328–340.

Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2008). Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell* 31, 708-21.

Cseh, B., Doma, E., and Baccharini, M. (2014). "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett* 588, 2398-2406.

Chen, Z., Otto, J.C., Bergo, M.O., Young, S.G., and Casey, P.J. (2000). The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *J Biol Chem* 275, 41251-41257.

Chen, J.L., Zhu, X., Zhao, T.L., Wang, J., Yang, Y.F., and Tan, Z.P. (2014). Rare copy number variations containing genes involved in RASopathies: deletion of SHOC2 and duplication of PTPN11. *Mol Cytogenet* 16, 7-28.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.

Chuang, C.F. and Ng, S.Y. (1994). Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett* 346, 229-234.

Cohen, P.T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241-256.

Cole, M.D. and Nikiforov, M.A. (2006). Transcriptional activation by the Myc oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol* 302. 33-50.

Coles, L.C. and Shaw, P.E. (2002). PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* 21, 2236-2244.

Cordeddu, V., Di Schiavi, E., Pennacchio, LA., Ma'ayan, A., Sarkozy, A., Fodale, V., Cecchetti, S., Cardinale, A., Martin, J., Schackwitz, W., *et al.* (2009). Mutation of SHOC2 promotes aberrant

protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 41, 1022-1026.

Dai, P., Xiong, W.C., and Mei, L. (2006). Erbin inhibits RAF activation by disrupting the Sur-8-Ras-Raf complex. *J Biol Chem* 281, 927-933.

Dajee, M., Tarutani, M., Deng, H., Cai, T., and Khavari, P.A. (2002). Epidermal Ras blockade demonstrates spatially localized Ras promotion of proliferation and inhibition of differentiation. *Oncogene* 21, 1527–1538.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, .S, Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Davies, H., G. R. Bignell, Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.

Doma, E., Rupp, C., and Baccarini, M. (2013). EGFR-Ras-Raf signaling in epidermal stem cells: roles in hair follicle development, regeneration, tissue remodeling and epidermal cancers. *Int J Mol Sci* 14, 19361-19384.

Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E.Y., Urosevic, J., Lechuga, C.G., Esteban, L.M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., and Barbacid, M. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J* 29, 1091-1104

Drosten, M., Lechuga, C.G., and Barbacid, M. (2014). Ras signaling is essential for skin development. *Oncogene* 33, 2857-2865.

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-666.

Dumesic, P.A., Scholl, F.A., Barragan, D.I., and Khavari, P.A. (2009). Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 185, 409–422.

Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 118, 2997-3002.

Ehrenreiter, K., Kern, F., Velamoor, V., Meissl, K., Galabova-Kovacs, G., Sibilía, M., and Baccarini, M. (2009). Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 16, 149-160.

Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R., Guo, X., and Schrader, J.W. (2002). Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30, 1089-1106.

Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., and Marais, R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res* 65, 9719-97126.

Esteban, L.M., Vicario-Abejón, C., Fernández-Salguero, P., Fernández-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., *et al.* (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 21, 1444–1452.

Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149.

Fernández-Medarde, A. and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2, 344-358.

Ferrell, J.E. and Bhatt, R.R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 19008-19016.

Franke, W.W., Cowin, P., Schmelz, M., and Kapprell, H.P. (1987). The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *Ciba Found Symp* 125, 26-48.

Fuchs, E. and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.

Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111, 2807–2814.

Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834–842.

Fukuda, M., Gotoh, Y., Tachibana, T., Dell, K., Hattori, S., Yoneda, Y., and Nishida, E. (1995). Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene* 11, 239–244.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752–1761.

Galabova-Kovacs, G., Catalanotti, F., Matzen, D., Reyes, G.X., Zezula, J., Herbst, R., Silva, A., Walter, I., and Baccarini, M. (2008). Essential role of B-Raf in oligodendrocyte maturation and myelination during postnatal central nervous system development. *J Cell Biol* 180, 947-955.

Galabova-Kovacs, G., Kolbus, A., Matzen, D., Meissl, K., Piazzolla, D., Rubiolo, C., Steinitz, K., and Baccarini, M. (2006). ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 5, 1514-1518.

Galaktionov, K., Jessus, C., and Beach, D. (1995). Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* 9, 1046-1058.

Galperin, E., Abdelmoti, L., and Sorkin, A. (2012). Shoc2 Is Targeted to Late Endosomes and Required for Erk1/2 Activation in EGF-Stimulated Cells. *Plos One* 7, e36469.

Gomez, G.A. and Daniotti, J.L. (2005). H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment. *J Biol Chem* 280, 34997-35010.

Griffiths, C.E. and Barker, J.N. (2007) Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370, 263-271.

Gripp, K.W., Zand, D.J., Demmer, L., Anderson, C.E., Dobyns, W.B., Zackai, E.H., Denenberg, E., Jenny, K., Stabley, D.L., and Sol-Church, K. (2013). Expanding the SHOC2 mutation associated phenotype of Noonan syndrome with loose anagen hair: structural brain anomalies and myelofibrosis. *Am J Med Genet A* 161, 420-430.

Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.

Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166. 557-580.

Hanning, V., Jeoung, M., Jang, E.R., Phillips, J.A 3rd., and Galperin, E. (2014). A Novel SHOC2 Variant in Rasopathy. *Hum Mutat* doi: 10.1002/humu.22634.

Hardy, M.H. (1992). The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8, 55-61.

Hay, R.J., Johns, N.E., Williams, H.C., Bolliger, I.W., Dellavalle, R.P., Margolis, D.J., Marks, R., Naldi, L., Weinstock, M.A., Wulf, S.K., *et al.* (2014). The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *J Invest Dermatol* 134, 1527–1534.

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Toshiyuki Hamaoka, T., and Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Gene cells* 8, 847-856.

Hekman, M., Hamm, H., Villar, A.V., Bader, B., Khulmann, J., Nickel, J., Rapp, U.R. (2002). Associations of B- and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine, and lipid second messengers: preferential binding of Raf to artificial lipid rafts. *J Biol Chem* 277. 24090-24102.

Hernandez-Martín, A. and Torrelo, A. (2011). Rasopatías: trastornos del desarrollo con predisposición al cáncer y manifestaciones cutáneas. *Actas Dermosifilio* 102, 402-416.

Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117, 4619-4628.

Janes, S.M. and Watt, F.M. (2006) New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 6, 175-183.

Jang, E.R., Shi, P., Bryant, J., Chen, J., Dukhante, V., Gentry, M.S., Jang, H., Jeoung, M., and Galperin, E. (2014). HUWE1 is a molecular link controlling RAF-1 activity supported by the Shoc2 scaffold. *Mol Cell Biol* 34, 3579-3593.

Jaumot, M., and Hancock, J.F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20, 3949-3958.

Jeoung, M., Abdelmoti, L., Jang, E.R., Vander Kooi, C.W., and Galperin, E. (2013). Functional Integration of the Conserved Domains of Shoc2 Scaffold. *PLoS One* 8, e66067.

Johansen, C., Kragballe, K., Westergaard, M., Henningsen, J., Kristiansen, K. and Iversen, L. (2005). The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 152, 37-42.

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., *et al.* (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11, 2468–2481.

Kaplan, F.M., Kugel, C.H. 3rd., Dadpey, N., Shao, Y., Abel, E.V., and Aplin, A.E. (2012). SHOC2 and CRAF mediate ERK1/2 reactivation in mutant NRAS-mediated resistance to RAF inhibitor. *J Biol Chem* 287, 41797-41807.

Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N. and Hay, N. (1997). The PI3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 11, 701-713.

Kern, F., Doma, E., Rupp, C., Niaux, T., and Baccarini, M. (2013). Essential, non-redundant roles of B-Raf and Raf-1 in Ras-driven skin tumorigenesis. *Oncogene* 32, 2483-2492.

Kern, F., Niaux, T., and Baccarini, M. (2011). Ras and Raf pathways in epidermis development and carcinogenesis. *Br J Cancer* 104, 229–234.

Khavari, T.A., and Rinn, J. (2007). Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle* 6, 2928–2931.

Kimmelman, A., Tolacheva, T., Lorenzi, M.V., Osada, M., Chan, A.M. (1997). Identification and characterization of R-ras3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution. *Oncogene* 15, 2675-2685.

Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-732.

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668-674.

Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15, 1151-1159.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351, 289-305.

Koster, M.I., and Roop, D.R. (2007). Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 93–113.

Koster, M.I. (2009). Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 7–10.

Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612.

Lavker, R.M. and Sun, T.(1983). Epidermal Stem Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 81, 121–127.

Lawrence, M.C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., and Earnest, S. (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* 18, 436-442.

Lechler, T. and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275–280.

Lee, Y., Jang, S., Min, J.K., Lee, K., Sohn, K.C., Lim, J.S., Im, M., Lee, H.E., Seo, Y.J., Kim, C.D., *et al.* (2012). S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 423, 647-653.

Lee, J., and Tumbar, T. (2012). Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin Cell Dev Biol* 23, 906–916.



León, G. (2010). Caracterización funcional de la proteína adaptadora Sur8. Tesis doctoral. Codirigida por el Dr. José M<sup>a</sup> Rojas Cabañeros y el Dr. José Luis Oliva. Laboratorio de Biología Celular, UFIEC (ISCI).

León, G., Sánchez-Ruiloba, L., Pérez-Rodríguez, A., Gragera, T., Martínez, N., Hernández, S., Anta, B., Calero, M., García-Dominguez, C.A., Durá, L.M., *et al.* (2014). Shoc2/Sur8 protein regulates neurite outgrowth. *PLoS One* 9, e114837.

Li, W., Han, M., and Guan, K.L. (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev* 14, 895-900.

Li, S. and Sedivy, J.M. (1993). Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9247-9251.

Lichtenberger, B.M., Gerber, P.A., Holcman, M., Buhren, B.A., Amberg, N., Smolle, V., Schrupf, H., Boelke, E., Ansari, P., Mackenzie, C., *et al.* (2013). Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. *Sci transl med* 5, 199ra111.

Lloyd, A.C. (2006). Distinct functions for ERKs?. *J Biol* 5, 13.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217.

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442.

Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O., and Lee, D.C. (1993). TGF $\alpha$  deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and Waved-1 mice. *Cell* 73, 263-278.

Luetkeke, N.C., Phillips, H.K., Qiu, T.H., Copeland, N.G., Earp, H.S., Jenkins, N.A., and Lee, D.C. (1994). The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 8, 399–413.

Mak, K.K., and Chan, S.Y. (2003). Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle. *J Biol Chem* 278, 26120-26126.

Mann, G.B., Fowler, K.J., Gabriel, A., Nice, E.C., Williams, R.L., and Dunn, A.R. (1993). Mice with a null mutation of the TGF $\alpha$  gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73, 249-261.

Marais, R., Wynne, J., Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *Embo J* 14, 3136-3145.

Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* 18, 2137-2148.

Matallanas, D., Sanz-Moreno, V., Arozarena, I., Calvo, F., Agudo-Ibáñez, L., Santos, E., Berciano, M.T., and Crespo, P. (2006). Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* 26, 100-116.

Matsunaga-Udagawa, R., Fujita, Y., Yoshiki, S., Terai, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., Yugi, K., Aoki, K., and Matsuda, M. (2010). The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. *J Biol Chem* 285, 7818-7826.

Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Porrazzo, A., Orban, P.C., Pakhotin, P., Krezel, W., Wezl, H., and Wolfer, D.P. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34, 807-820.

McKay, M.M. and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113–3121.

Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.

Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376, 337-341.

Mendoza, M.C., Er, E.E., Zhang, W., Ballif, B.A., Elliott, H.L., Danuser, G., and Blenis, J. (2011). ERK-MAPK Drives Lamellipodia Protrusion by Activating the WAVE2 Regulatory Complex. *Mol Cell* 41, 661–671.

Meredith, J., Fazeli, B., and Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4, 953-961.

Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., R  th, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* 20, 1952-1962.

Millar, S.E. (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol* 118, 216–225.

Moon, B.S., Kim, H.Y., Kim, M.Y., Yang, D.H., Lee, J.M., Cho, K.W., Jung, H.S., and Choi, K.Y. (2011). Sur8/Shoc2 involves both inhibition of differentiation and maintenance of self-renewal of neural progenitor cells via modulation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *Stem Cells* 29, 320-331.

Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L. and Ulke-Lem  e, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 234-244.

Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, 4.

Morrison, D.K. and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 91-118.

Murillas, R., Larcher, F., Conti, C.J., Santos, M., Ullrich, A., and Jorcano, J.L. (1995). Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J* 14, 5216-5223.

Nakamura, K., Ichise, H., Nakao, K., Hatta, T., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., and Katsuki, M. (2008). Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. *Oncogene* 27, 2961-2968.

Nguyen, A., Burack, W.R., Stock, J.L., Kortum, R., Chaika, O.V., Afkarian, M., Muller, W.J., Murphy, K.M., Morrison, D.K., and Lewis, R.E. (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* 22, 3035-3045.

Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2-16.

Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., and Itoh, N. (2000). FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 643-649.

O'Neill, E. and Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 90, 283-288.

Ono, K. and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.

Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective Thymocyte Maturation in p44 MAP Kinase (Erk 1) Knockout Mice. *Science* 284, 1374-1377.

- Park, E.R., Eblen S.T., and Catling, A.D. (2007). MEK1 activation by PAK: a novel mechanism. *Cell Signal* 19, 1488-1496.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariotti, F., Dattilo, C., Mariani, V., and Girolomoni, G. (2005). ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *J Immunol* 174, 5047-5056.
- Petiot, A., Conti, F.J.A., Grose, R., Revest, J.M., Hodivala-Dilke, K.M., and Dickson, C. (2003). A crucial role for Fgfr2-IIIb signaling in epidermal development and hair follicle patterning. *Development* 130, 5493–5501.
- Philips, M.R. (2005). Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* 33, 657-661.
- Piepoli, A., Palmieri, O., Maglietta, R., Panza, A., Cattaneo, E., Latiano, A., Laczko, E., Gentile, A., Carella, M., Mazzocchi, G., *et al.* (2012). The expression of leucine-rich repeat gene family members in colorectal cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 237, 1123-1128.
- Plowman, S.J. and Hancock, J.F. (2005). Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1746, 274-283.
- Potten, C.S. and Morris, R.J. (1988). Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl.* 10, 45-62.
- Potts R.O. and Francoeur, M.L. (1991). The Influence of Stratum Corneum Morphology on Water Permeability. *Journal of Investigative Dermatology* 96, 495–499.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., and Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178.
- Prior, I.A. and Hancock, J.F. (2001). Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci* 114, 1603-1608.

Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 160, 165-170.

Pritchard, C.A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 6, 614-617

Raabe, T. and Rapp, U.R. (2003). Ras signaling: PP2A puts Ksr and Raf in the right place. *Curr Biol* 13, R635-637.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R., and Albert, S. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1177-1195.

Rebollo, A., Perez-Sala, D., and Martínez-A, C. (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18, 4930-4939.

Resing, K.A. and Dale, B.A. (1991) Proteins of Keratohyalin. *Biochemistry and Physiology of the Skin*. (Ed., Goldsmith, L.A.). Oxford University Press 1, 148-167.

Ritt, D. A., Daar, I.O., Morrison, D.K. (2005). KSR Regulation of the Raf-MEK-ERK Cascade. *Methods Enzymol* 407, 224-37.

Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310.

Rodríguez-Viciana, P., Osés-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M., and McCormick, F. (2006). A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell* 22, 217-230.

Rojas, A.M., Fuentes, G., Raussell, A., and Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* 196, 189–201.

Roy, S., McPherson, R.A., Apolloni, A., Yan, J., Lane, A., Clyde-Smith, J., and Hancock, J.F. (1998). 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 18, 3947-3955.

Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26, 2262-2272.

Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4, 964-968.

Sakai, Y., Nelson, K.G., Snedeker, S., Bossert, N.L., Walker, M.P., McLachlan, J., and DiAugustine, R.P. (1994). Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 5, 527-535.

Satake, S., Kuzuya, M., Ramos, M., Kanda, S., and Iguchi, A. (1998). Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 642-646.

Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F., and Giachelli, C.M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 141, 1083-1093.

Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 19, R132-R142

Schneider, M.R., Werner, S., Paus, R., and Wolf, E. (2008). Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 173, 14-24.

Schwenk, F., Kühn, R., Angrand, P.O., Rajewsky, K. and Stewart, A.F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nuc Acid Res* 26, 1427-1432.

Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., and Hancock, J.F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1463-1467.

Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Bissonauth, V., Charron, J., and Khavari, P.A. (2007). Mek1/2 MAPK kinases are essential for mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell* 12, 615–629.

Scholl, F.A., Dumesic, P.A., and Khavari, P.A. (2004). Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res* 64, 6035-6040.

Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Charron, J., and Khavari, P.A. (2009). Selective role for Mek1 but not Mek2 in the induction of epidermal neoplasia. *Cancer Res* 69, 3772-3778.

Selfors, L.M., Schutzman, J.L., Borland, C.Z., and Stern, M.J. (1998). soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6903-6908.

Sibilia, M. and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234–238.

Sieburth, D.S., Sun, Q., and Han, M. (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signalling in *C.elegans*. *Cell* 94, 119-130.

Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 565–580.

Smith, J. A., Poteet-Smith, C.E., Malarkey, K., Sturgill, T.W. (1999). Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem* 274, 2893-2898.

Sotiropoulou, P.A. and Blanpain, C. (2012). Development and Homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008383.

Takahashi, H., Ibe, M., Nakamura, S., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y. and Iizuka. H. (2002). Extracellular regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase are activated in psoriatic involved epidermis. *J Dermatol Sci* 30, 94-99.



Takenouchi, T., Sakamoto, Y., Miwa, T., Torii, C., Kosaki, R., Kishi, K., Takahashi, T., and Kosaki, K. (2014). Severe craniosynostosis with Noonan syndrome phenotype associated with SHOC2 mutation: Clinical evidence of crosslink between FGFR and RAS signaling pathways. *Am J Med Genet A*. 164(11):2869-2872.

Tanoue, T. and Nishida, E. (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15, 455-462.

Tarutani, M., Cai, T., Dajee, M., and Khavari, P.A. (2003). Inducible activation of Ras and Raf in adult epidermis. *Cancer Res* 63, 319-323.

Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci* 94, 7400-7405.

Teis, D., Wunderlich, W., and Huber, L.A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3, 803-814.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., *et al.* (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230–234.

Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., and Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97, 697-702.

Tidyman, W.E. and Rauen, K.A. (2009). The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 19, 230–236.

Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicer, A., and Kucherlapati, R. (1995). The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1709-1713.

van der Geer, P., and Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20, 277-280.

Valluet, A., Druillennec, S., Barbotin, C., Dorard, C., Monsoro-Burq, A.H., Larcher, M., Pouponnot, C., Baccarini, M., Larue, L., and Eychène, A. (2012) B-Raf and C-Raf Are Required for Melanocyte Stem Cell Self-Maintenance. *Cell Rep* 25, 774-780.

Villaschi, S and Nicosia, R.F. (1993). Angiogenic role of basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol* 143,182–190.

Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.

Wang, S., Ghosh, R.N., and Chellappan, S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18, 7487-7498.

Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R., and Reed, J.C. (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7063-7068.

Warren, C.M. and Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18, 923-33.

Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-1920.

Waskiewicz, A.J., Johnson, J.C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S.R., and Cooper, J.A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 1871-1880.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875–885.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.

- Weston, C.R. and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19, 142-149.
- Wojnowski, L., Zimmer, A.M., Beck, T.W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U.R., and Zimer, A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 16, 293-297.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125, 753-765.
- Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., and Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* 16, 1171-82.
- Yao, R. and Cooper, G.M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K. and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12759-12764.
- Yi, J., Chen, M., Wu, X., Yang, X., Xu, T., Zhuang, Y., Han, M., and Xu, R. (2010). Endothelial SUR-8 acts in an ERK-independent pathway during atrioventricular cushion development. *Dev Dyn* 239, 2005-2013.
- Yoshiki, S., Matsunaga-Udagawa, R., Aoki, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2010). Ras and calcium signaling pathways converge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein. *Mol Biol Cell* 21, 1088-1096.
- Young, L.C., Hartig, N., Muñoz-Alegre, M., Oses-Prieto, J.A., Durdu, S., Bender, S., Vijayakumar, V., Rudan M.V., Gewinner, C., Henderson, S., *et al.* (2013). An MRAS, SHOC2, and SCRIB complex coordinates ERK pathway activation with polarity and tumorigenic growth. *Mol Cell* 52, 679-692.
- Zang, M., Hayne, C., and Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.

Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., and Greene, M.I. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117, 2051-2058.

Zhang, W. and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12. 9-18.

Zheng, C.F. and Guan K.L. (1993). Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 268, 11435-11439.

Ziogas, A., Moelling, K., and Radziwill, G. (2005). CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation. *J Biol Chem* 280, 24205-24211.

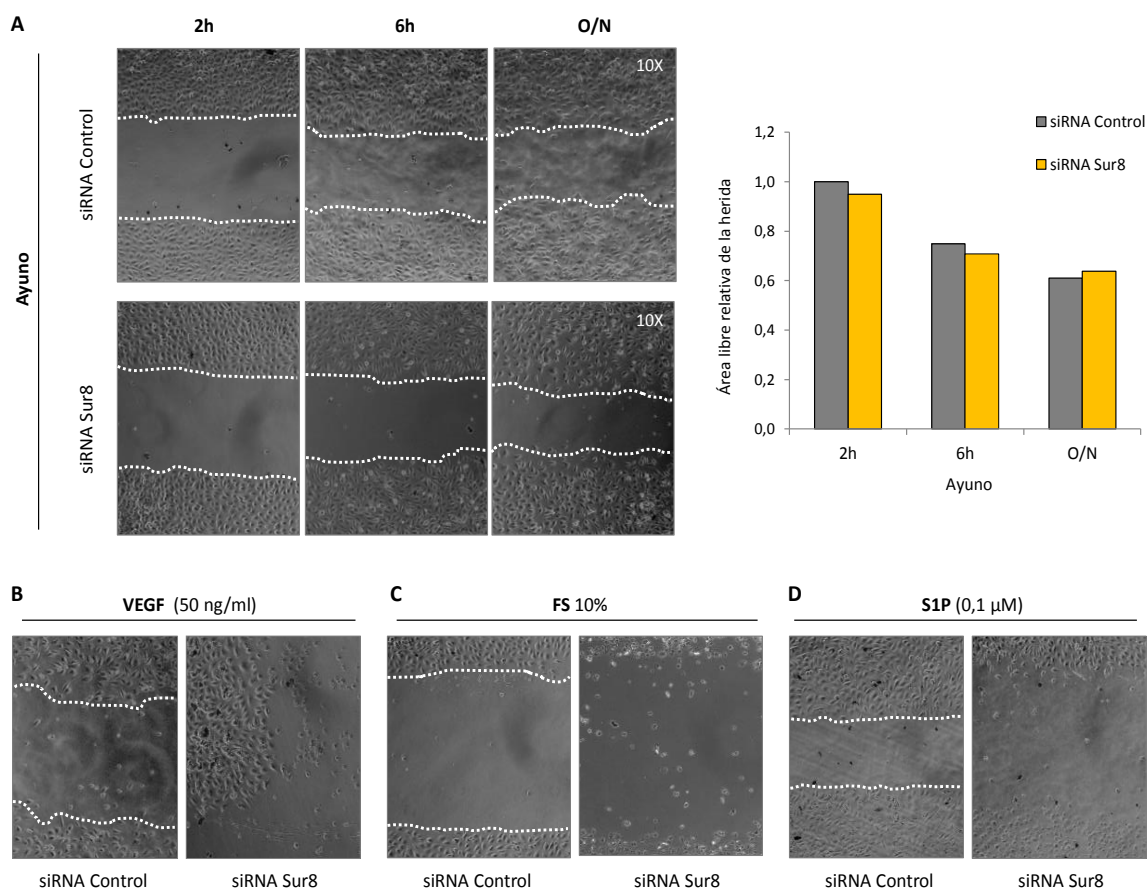




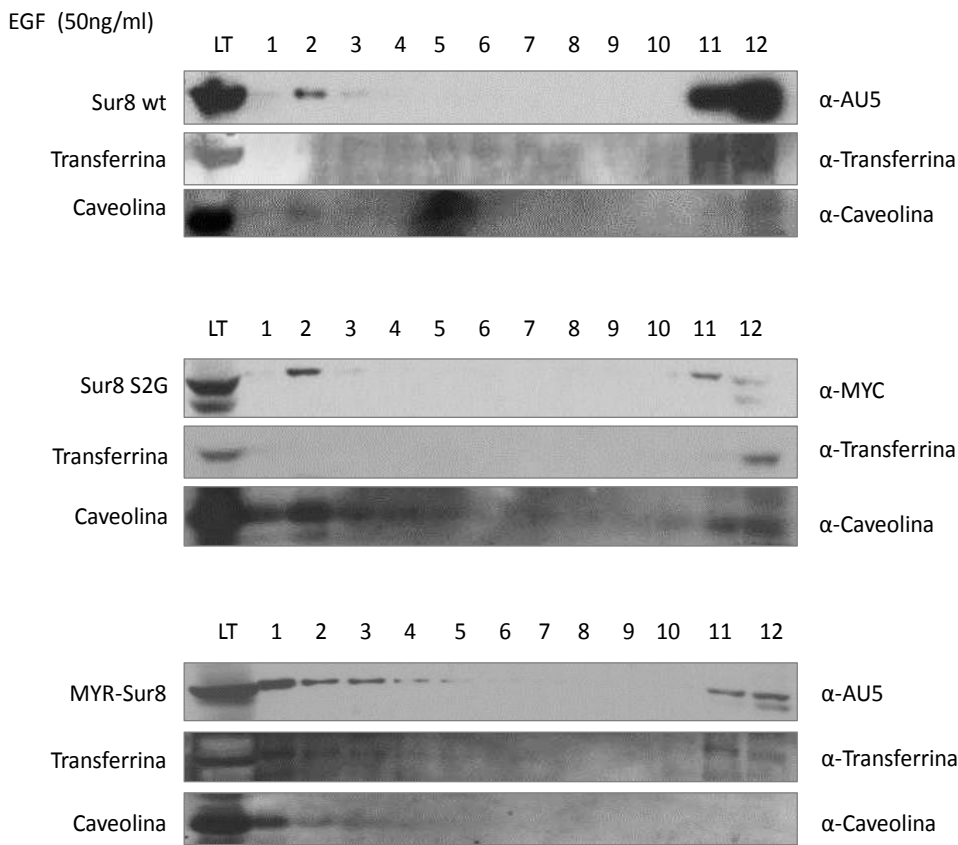
# ANEXOS



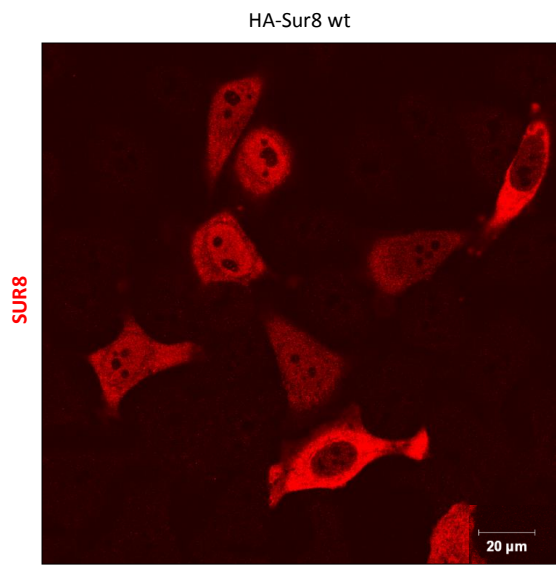




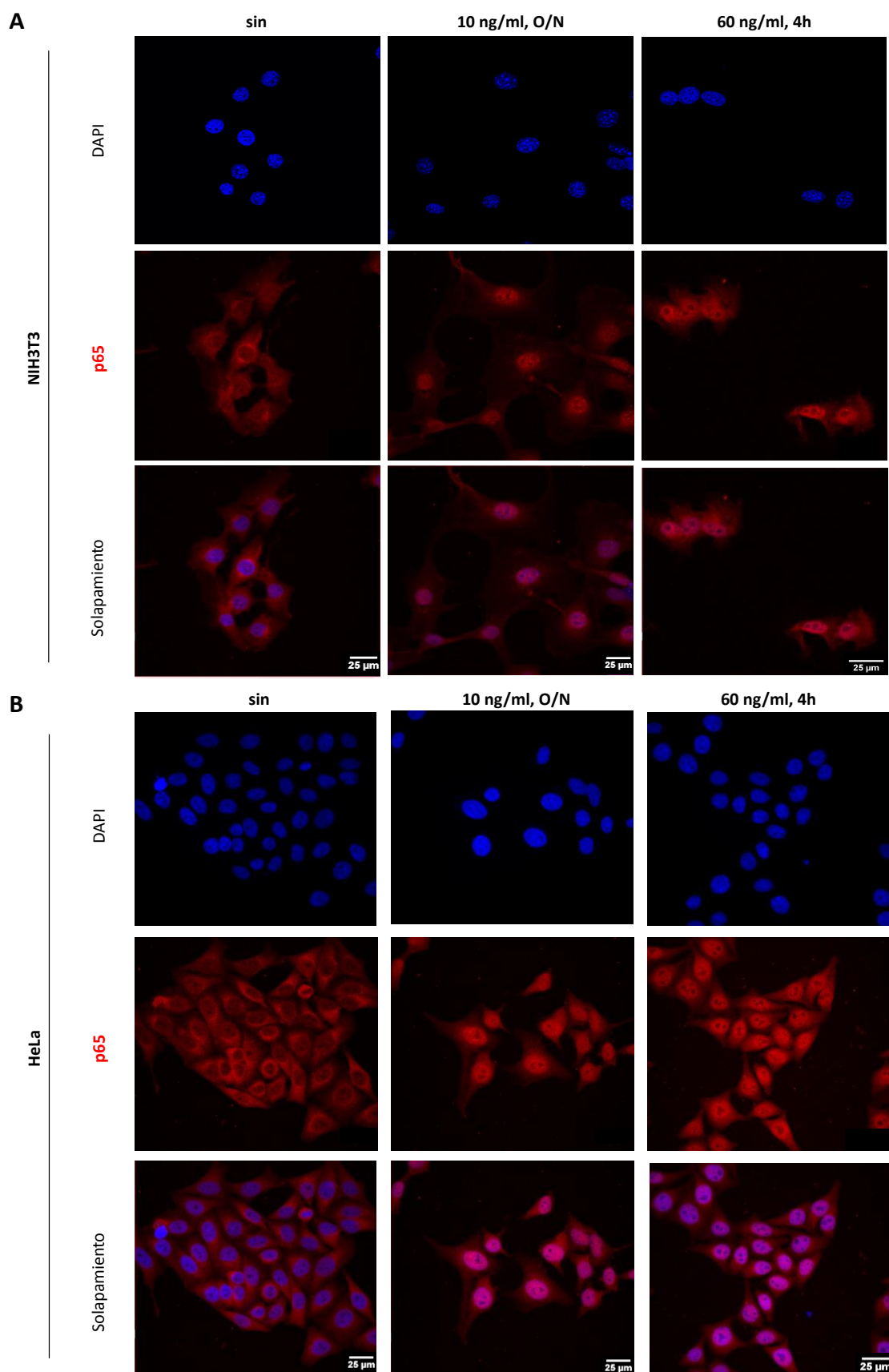
**ANEXO 1. LA DEPLECIÓN DE SUR8 INDUCE MUERTE CELULAR EN HUVEC EN CONDICIONES MIGRATORIAS.** Imágenes de microscopio óptico de células HUVEC a las 2h, 6h y O/N de realizar la herida. (A) Células en ayuno crecidas en alta confluencia sobre cristales tratados con colágeno tipo I. En el histograma se representa la cuantificación del área libre de células que queda en la herida a lo largo del tiempo en células sin Sur8 o células control; Células tratadas con VEGF (50 ng/ml) (B), FS 10% (C) o S1P (0,1 μM) (D), en medio 0,5% BSA-DMEN. Fotografías tomadas a las 6h. Experimento representativo de dos ensayos independientes. Aumento 10X.



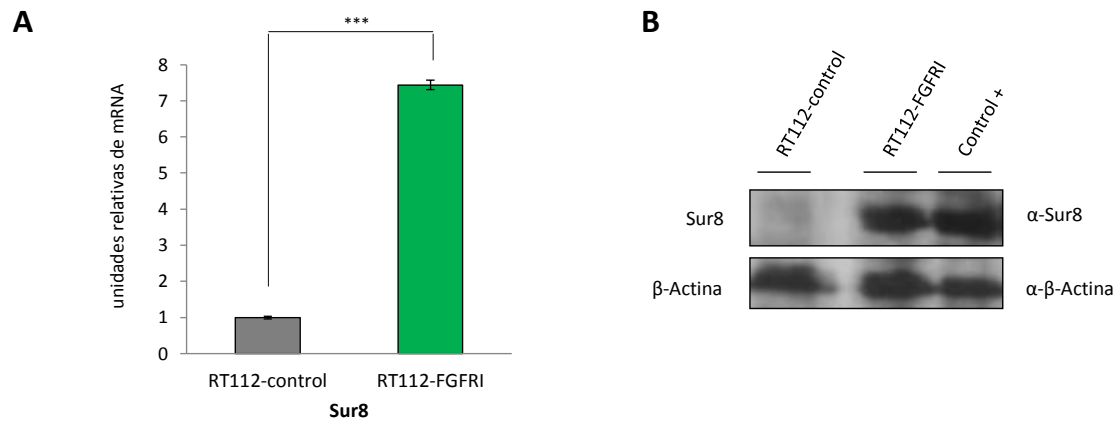
**ANEXO 2. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE SUR8 EN MICRODOMINIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA TRAS ESTIMULACIÓN CON EGF.** Separación en gradientes de sacarosa de extractos de células HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-AU5-Sur8 wt, pEF1-Sur8 S2G-MYC o pCEFL-KZ-AU5-MYR-Sur8 y que se privaron de suero durante 16h antes de su estimulación con EGF (50 ng/ml, 10 min). LT: Lisado total. El análisis por WB se realizó usando, como anticuerpos primarios, α-AU5 para detectar Sur8 wt y MYR-Sur8 o α-MYC para la detección de Sur8 S2G, y α-Transferrina y α-Caveolina como controles de los distintos microdominios de membrana. Este experimento se realizó tres veces con similares resultados.



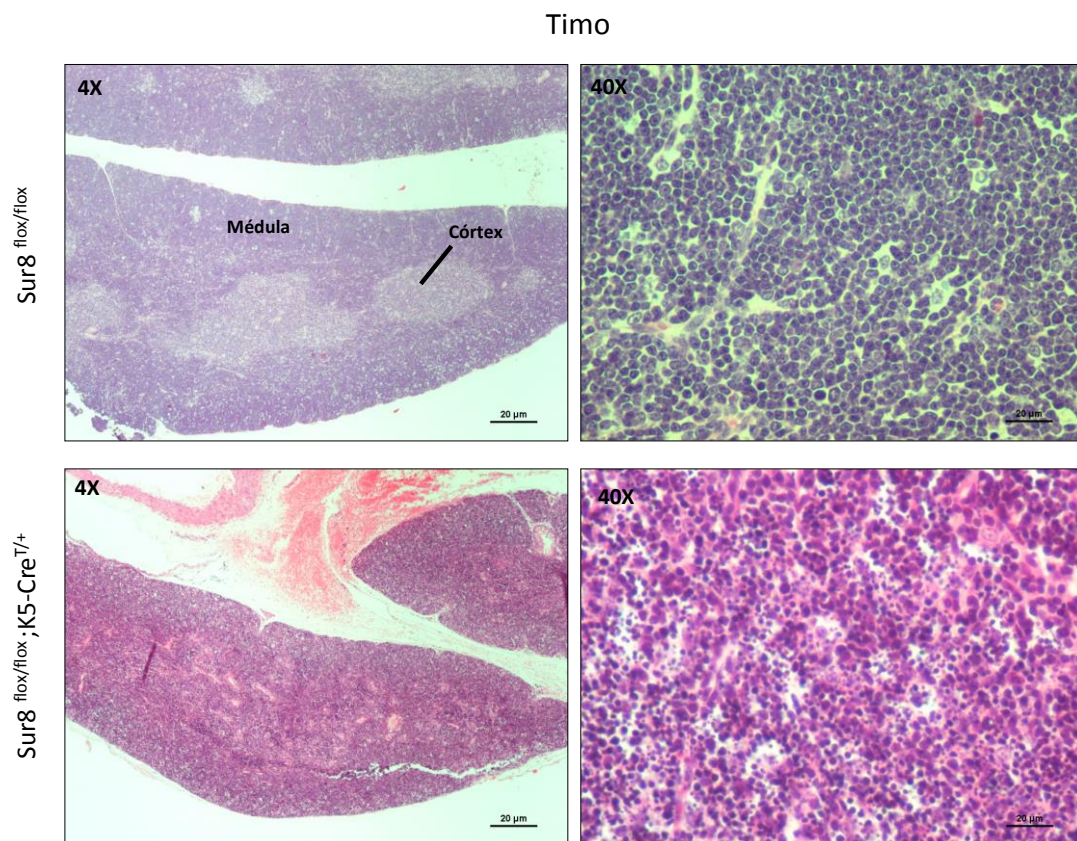
**ANEXO 3. DISTRIBUCIÓN DE SUR8 EN CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS.** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt, mantenidas en cultivo con FS 10%. Se empleó α-Sur8, seguido de α-conejo Alexa Flúor como anticuerpo secundario para la visualización de Sur8.



**ANEXO 4. ESTUDIO DE LA EXPORTACIÓN DE p65 DESDE EL NÚCLEO CELULAR.** Células NIH3T3 (A) y HeLa (B) mantenidas en condiciones normales de cultivo, fueron tratadas con o sin Leptomycin B a diferentes concentraciones (10 ng/ml o 60 ng/ml) y tiempos (4h-O/N). La detección de p65 se realizó con  $\alpha$ -p65 y  $\alpha$ -conejo Texas Red. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.



**ANEXO 5. EXPRESIÓN DE SUR8 EN LÍNEAS RT112-CONTROL Y RT112-FGFRI.** (A) Análisis por qRT-PCR del mRNA *SUR8* en RNA aislado de cultivos de células RT112-control y RT112-FGFRI. La expresión de *SUR8* se normalizó respecto a *GAPDH*. Las barras de error muestran la desviación estándar. \*\*\*: p<0.001.; (B) Detección por WB de Sur8 y  $\beta$ actina como control de carga, empleando los anticuerpos primarios  $\alpha$ -Sur8 y  $\alpha$ - $\beta$ actina respectivamente. Se incluye un extracto celular de HEK 293T transfectadas con pCEFL-KZ-HA-Sur8 wt como control positivo.



**ANEXO 8. REGRESIÓN DEL TIMO EN LOS RATONES KO PARA SUR8 EN EPIDERMIS.** Secciones de timo de animales de 5 meses de edad teñidas con H&E. En el animal Sur8<sup>flox/flox</sup> se indican las zonas correspondientes a la médula y al córtex del timo. A 40X se observan las células apoptóticas en los animales Sur8<sup>flox/flox</sup>;K5-Cre<sup>T/+</sup>.



Anexo 6. Proteínas que interaccionan con Sur8 en células HEK 293T.

Accession	Description	Function	Location	Sequest	Mascot	1st IP	MW [kDa]
Specific proteins identified with confidence							
Q9UQL3	Leucine-rich repeat protein SHOC2 OS=Homo sapiens GN=SHOC2 PE=1 SV=2 - [SHOC2_HUMAN]	TARGET		+	+	+	64.8
Q9NUQ6	SPATS2-like protein OS=Homo sapiens GN=SPATS2L PE=1 SV=2 - [SPS2L_HUMAN]	Unknown	Nucleus, cytoplasm	+	+	+	61.7
Q8WU04	General transcription factor 3C polypeptide 2 OS=Homo sapiens GN=GTF3C2 PE=1 SV=2 - [TF3C2_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	+	100.6
Q9UIX3	Anaphase-promoting complex subunit 7 OS=Homo sapiens GN=ANAPC7 PE=1 SV=3 - [APC7_HUMAN]	Mitosis, degradation	Nucleus, cytoplasm	+	+	+	63.1
Q8IV67	Ribonucleoprotein PTB-binding 1 OS=Homo sapiens GN=RAVER1 PE=1 SV=1 - [RAVR1_HUMAN]	RNA splicing	Nucleus, cytoplasm	-	+	-	63.9
Q9UKN8	General transcription factor 3C polypeptide 4 OS=Homo sapiens GN=GTF3C4 PE=1 SV=2 - [TF3C4_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	91.9
Q71RC2	La-related protein 4 OS=Homo sapiens GN=LARP4 PE=1 SV=3 - [LARP4_HUMAN]	Cytoskeleton	Unknown	+	+	-	80.5
Q96B26	Exosome complex exonuclease RRP43 OS=Homo sapiens GN=EXOS8_HUMAN]	RNA processing	Nucleus, cytoplasm	+	+	-	30.0
Q9NY61	Protein AATF OS=Homo sapiens GN=AATF PE=1 SV=1 - [AATF_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	63.1
Q96IM7	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=L3MBTL3 PE=1 SV=2 - [LMBL3_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	88.3
Q8WWK9	Putative RNA-binding protein 16 OS=Homo sapiens GN=RBM16 PE=1 SV=1 - [RBM16_HUMAN]	RNA processing, RNA splicing	Nucleus	+	-	-	76.9
Q9HC36	THO complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=THOC2 PE=1 SV=2 - [THOC2_HUMAN]	RNA splicing	Nucleus	+	-	-	47.0
Q8NDF8	WD repeat-containing protein 46 OS=Homo sapiens GN=WDR46 PE=1 SV=3 - [WDR46_HUMAN]	Unknown	Unknown	+	-	-	63.2
Q8NHQ9	ATP-dependent RNA helicase DDX55 OS=Homo sapiens GN=DDX55 PE=1 SV=2 - [DDX55_HUMAN]	RNA biology	Unknown	-	+	-	68.4
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein OS=Homo sapiens GN=NFRKB PE=1 SV=2 - [NFRKB_HUMAN]	DNA repair, Transcription	Nucleus	+	+	-	138.9
Q75122	CUP-associating protein 2 OS=Homo sapiens GN=CLASP2 PE=1 SV=2 - [CLAP2_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	+	+	-	141.0
P42694	Probable helicase with zinc finger domain OS=Homo sapiens GN=HELZ PE=1 SV=2 - [HELZ_HUMAN]	RNA biology	Nucleus	+	+	-	218.8
Q9H9A5	CCR4-NOT transcription complex subunit 10 OS=Homo sapiens GN=CNOT10 PE=1 SV=1 - [CNO10_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	82.3
P17029	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1 OS=Homo sapiens GN=ZKSCAN1 PE=1 SV=3 - [ZKSC1_HUMAN]	Transcription	Nucleus	-	+	-	63.6
Q75QN2	Integrator complex subunit 8 OS=Homo sapiens GN=INTS8 PE=1 SV=1 - [INT8_HUMAN]	Transcription, RNA splicing	Nucleus	+	+	-	113.0
Q86Y37	Uncharacterized protein C10orf46 OS=Homo sapiens GN=C10orf46 PE=2 SV=1 - [C1046_HUMAN]	Cell cycle	Unknown	+	+	-	41.0
Q9NSV4	Protein diaphanous homolog 3 OS=Homo sapiens GN=DIAPH3 PE=1 SV=4 - [DIAP3_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	-	+	-	136.8
O14757	Serine/threonine-protein kinase Chk1 OS=Homo sapiens GN=CHKE1 PE=1 SV=1 - [CHK1_HUMAN]	DNA repair, cell cycle	Nucleus, cytoplasm	+	+	-	54.4
Q75554	WW domain-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=WBR4 PE=1 SV=1 - [WBR4_HUMAN]	RNA splicing	Nucleus	+	+	-	42.5
P29992	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 OS=Homo sapiens GN=GNA11 PE=1 SV=2 - [GNA11_HUMAN]	Signaling	Membrane	+	+	-	42.1
Q68EM7	Rho GTPase-activating protein 17 OS=Homo sapiens GN=ARHGAP17 PE=1 SV=1 - [RHG17_HUMAN]	Signaling	Membrane	+	+	-	95.4
Q9NWT1	p21-activated protein kinase-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PAK1P1 PE=1 SV=2 - [PK1P_HUMAN]	Signaling	Nucleus	+	+	-	43.9
Q12923	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 OS=Homo sapiens GN=PTPN13 PE=1 SV=2 - [PTN13_HUMAN]	Signaling, cytoskeleton	Nucleus, cytoplasm	+	+	-	276.7
P48382	DNA-binding protein RFX5 OS=Homo sapiens GN=RFX5 PE=1 SV=1 - [RFX5_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	65.3
Q9UIU6	Homeobox protein SIX4 OS=Homo sapiens GN=SIX4 PE=1 SV=2 - [SIX4_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	82.9
Q86T12	Transcriptional adapter 2-beta OS=Homo sapiens GN=TADA2B PE=1 SV=2 - [TAD2B_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+	-	48.4
Q9H9A6	Leucine-rich repeat-containing protein 40 OS=Homo sapiens GN=LRRC40 PE=1 SV=1 - [LRC40_HUMAN]	Unknown	Unknown	+	+	-	68.2
O60341	Lysine-specific histone demethylase 1 OS=Homo sapiens GN=KDM1 PE=1 SV=2 - [KDM1_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription	Nucleus	+	+	-	92.8
Q8N857	Protein enabled homolog OS=Homo sapiens GN=ENAH PE=1 SV=2 - [ENAH_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	+	+	-	66.5
Q9H9F9	Actin-related protein 5 OS=Homo sapiens GN=ACTR5 PE=1 SV=2 - [ARP5_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	-	+	-	68.3
P49454	Centromere protein F OS=Homo sapiens GN=CENPF PE=1 SV=2 - [CENPF_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	+	+	-	367.5
Q27AK8	Mutated melanoma-associated antigen 1 OS=Homo sapiens GN=MUM1 PE=1 SV=3 - [MUM1_HUMAN]	DNA repair	Nucleus	+	+	-	78.6
Q9UBU8	Mortality factor 4-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=MORF4L1 PE=1 SV=2 - [MO4L1_HUMAN]	DNA repair, Transcription	Nucleus	-	+	-	41.4
Q96E28	Microsphereule protein 1 OS=Homo sapiens GN=MCRS1 PE=1 SV=1 - [MCRS1_HUMAN]	DNA repair, Transcription	Nucleus	+	+	-	51.8
P19447	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit OS=Homo sapiens GN=ERC3 PE=1 SV=1 - [ERC3_HUMAN]	DNA repair, Transcription	Nucleus	+	+	-	89.2
Q99504	Eyes absent homolog 3 OS=Homo sapiens GN=EYA3 PE=1 SV=3 - [EYA3_HUMAN]	DNA repair, Transcription	Nucleus, cytoplasm	+	+	-	62.6
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NP1L1 PE=1 SV=1 - [NP1L1_HUMAN]	DNA replication	Nucleus	+	+	-	45.3



P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Homo sapiens GN=PKM2 PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	Metabolism		+	+	57.9
Q96EP5	DAZ associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=DAZAP1 PE=1 SV=1 - [DAZP1_HUMAN]	RNA biology		+	+	43.4
Q12929	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 OS=Homo sapiens GN=EP58 PE=1 SV=1 - [EP58_HUMAN]	Signaling		+	+	91.8
Q9Y520	Protein BAT2-like 2 OS=Homo sapiens GN=BAT2L2 PE=1 SV=2 - [BA2L2_HUMAN]	Unknown		+	+	316.7
Q13501	Sequestosome-1 OS=Homo sapiens GN=SQSTM1 PE=1 SV=1 - [SQSTM_HUMAN]	Apoptosis, signaling		+	+	47.7
Q9C0C2	182 kDa tankyrase-1-binding protein OS=Homo sapiens GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=3 - [TB182_HUMAN]	Chromatin regulation, RNA biology		+	+	181.7
P78332	RNA-binding protein 6 OS=Homo sapiens GN=RBM6 PE=1 SV=5 - [RBM6_HUMAN]	RNA biology		+	+	128.6
Q95453	Poly(A)-specific ribonuclease PARN OS=Homo sapiens GN=PARN PE=1 SV=1 - [PARN_HUMAN]	RNA biology		+	+	73.4
O43447;Q0P5D	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H OS=Homo sapiens GN=PIPH PE=1 SV=1 - [PIPH_HUMAN]	RNA splicing		+	+	19.2
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPO PE=1 SV=2 - [SFPO_HUMAN]	RNA splicing, transcription		+	+	76.1
Q9H1H8	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ASCC2 PE=1 SV=3 - [ASCC2_HUMAN]	Transcription		+	+	86.3
P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4 - [S10A7_HUMAN]	Unknown		+	+	11.5
Q965T3	RNA-binding protein 42 OS=Homo sapiens GN=RBM42 PE=1 SV=1 - [RBM42_HUMAN]	RNA biology		+	+	145.1
Q9NP11	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=RRP9 PE=1 SV=1 - [U3IP2_HUMAN]	RNA processing		+	-	74.1
Q9BXK1	Cleavage stimulation factor subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CSTF2 PE=1 SV=1 - [CSTF2_HUMAN]	RNA biology		+	-	25.4
Q9UB89	Protein scribble homolog OS=Homo sapiens GN=SCRIB PE=1 SV=4 - [SCRIB_HUMAN]	Signaling, cytoskeleton		+	-	96.8
Q14344	Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3 - [H15_HUMAN]	Chromatin regulation		+	-	44.0
Q99496	Histone acetyltransferase MYST2 OS=Homo sapiens GN=MYST2 PE=1 SV=1 - [MYST2_HUMAN]	Chromatin regulation		+	-	37.6
Q9NMV9	Retinoid acid-induced protein 1 OS=Homo sapiens GN=RAI1 PE=1 SV=2 - [RAI1_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	-	80.2
Q9Y266	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=G3BP2 PE=1 SV=2 - [G3BP2_HUMAN]	RNA biology		+	-	38.2
P33240	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4 - [MARCKS_HUMAN]	Signaling, cytoskeleton		+	-	60.9
Q5VT52	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2 OS=Homo sapiens GN=POLR2B PE=1 SV=1 - [RPB2_HUMAN]	Transcription		+	-	155.9
Q14160	Zinc finger CCHC-type with G patch domain-containing protein OS=Homo sapiens GN=ZGPAT PE=1 SV=3 - [ZGPAT_HUMAN]	Transcription		+	-	178.4
O43257;Q241V4	Zinc finger HIT domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZNHT1 PE=1 SV=1 - [ZNHT1_HUMAN]	Apoptosis, chromatin regulation		+	+	17.5
Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=GADD45GIP1 PE=1 SV=1 - [G4SIP_HUMAN]	Cell cycle		+	+	25.4
Q96920	Protein TBRG4 OS=Homo sapiens GN=TBRG4 PE=1 SV=1 - [TBRG4_HUMAN]	Cell cycle		+	+	70.7
Q14207	Protein NPAT OS=Homo sapiens GN=NPAT PE=1 SV=2 - [NPAT_HUMAN]	Cell cycle, transcription		+	+	154.2
Q9Y2K7	Lysine-specific demethylase 2A OS=Homo sapiens GN=KDM2A PE=1 SV=3 - [KDM2A_HUMAN]	Chromatin regulation		+	+	132.7
Q15645	Thyroid receptor-interacting protein 13 OS=Homo sapiens GN=TRIP13 PE=1 SV=2 - [TRP13_HUMAN]	Chromatin regulation		+	+	48.5
Q6UWZ7	BRCA1-A complex subunit Abraxas OS=Homo sapiens GN=FAI175A PE=1 SV=2 - [FI175A_HUMAN]	Chromatin regulation		+	+	46.6
Q9NNX7	BRCA1-A complex subunit BRE OS=Homo sapiens GN=BRE PE=1 SV=2 - [BRE_HUMAN]	Chromatin regulation		+	+	43.5
Q99728	BRCA1-associated RING domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=BARD1 PE=1 SV=2 - [BARD1_HUMAN]	Chromatin regulation		+	+	86.6
P46736	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Homo sapiens GN=BRCC3 PE=1 SV=2 - [BRCC3_HUMAN]	Chromatin regulation, DNA repair		+	+	36.0
P45973	Chromobox protein homolog 5 OS=Homo sapiens GN=CBX5 PE=1 SV=1 - [CBX5_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	22.2
Q9H7L9	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3 OS=Homo sapiens GN=SDS3 PE=1 SV=2 - [SDS3_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	38.1
Q8N5Y2	Male-specific lethal 3 homolog OS=Homo sapiens GN=MSL3 PE=1 SV=1 - [MS3L1_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	59.8
Q96B05	PHD finger protein 21A OS=Homo sapiens GN=PHF21A PE=1 SV=1 - [PF21A_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	74.8
Q15022	Polycomb protein SUZ12 OS=Homo sapiens GN=SUZ12 PE=1 SV=3 - [SUZ12_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	83.0
Q9NPG3	Ubinuclein-1 OS=Homo sapiens GN=UBN1 PE=1 SV=2 - [UBN1_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	121.4
Q96L73	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific OS=Homo sapiens GN=NSD1 PE=1 SV=1 - [NSD1_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription		+	+	296.5
Q9H3Q1	Cdc42 effector protein 4 OS=Homo sapiens GN=CDC42EP4 PE=1 SV=1 - [BORG4_HUMAN]	Cytoskeleton		+	+	38.0
Q94927	HAUS augmin-like complex subunit 5 OS=Homo sapiens GN=HAU55 PE=1 SV=2 - [HAU55_HUMAN]	Cytoskeleton		+	+	71.6
Q15019	Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEPT2 PE=1 SV=1 - [SEPT2_HUMAN]	Cytoskeleton		+	+	41.5
Q1UGU1	Gamma-tubulin complex component 4 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP4 PE=1 SV=1 - [GCP4_HUMAN]	Cytoskeleton		+	+	76.0
Q9Y613	FH1/FH2 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=FHOD1 PE=1 SV=3 - [FHOD1_HUMAN]	Cytoskeleton		+	+	126.5

Q75044	SUT-HOBB Rho GTPase-activating protein 2 OS=Homo sapiens GN=SRGAP2 PE=1 SV=2 - [FNBP2_HUMAN]				Cytoskeleton	+	+	-	120,8
Q9Y6X4	Protein FAM169A OS=Homo sapiens GN=FAM169A PE=1 SV=2 - [F169A_HUMAN]				Cytoskeleton	+	+	-	74,9
A6NC98	Coiled-coil domain-containing protein 88B OS=Homo sapiens GN=CDC88B PE=1 SV=1 - [CC88B_HUMAN]				Cytoskeleton	-	+	-	164,7
P85298	Rho GTPase-activating protein 8 OS=Homo sapiens GN=ARHGAP8 PE=1 SV=1 - [RHG08_HUMAN]				Cytoskeleton, signaling	-	+	-	53,5
O43157	Plexin-B1 OS=Homo sapiens GN=PLXNB1 PE=1 SV=3 - [PLXB1_HUMAN]				Membrane, secreted	-	+	-	232,2
Q9NZC9	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=SMARCA11 PE=1 SV=1 - [SMAL1_HUMAN]				Nucleus	+	+	-	105,9
P31941	DNA dc->du-editing enzyme APOBEC-3A OS=Homo sapiens GN=APOBEC3A PE=1 SV=3 - [ABC3A_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	-	+	-	23,0
P78549	Endonuclease III-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=NTHL1 PE=1 SV=2 - [NTHL1_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	34,4
P07992	DNA excision repair protein ERCC-1 OS=Homo sapiens GN=ERCC1 PE=1 SV=1 - [ERCC1_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	32,5
Q95243	Methyl-CpG-binding domain protein 4 OS=Homo sapiens GN=MBD4 PE=1 SV=1 - [MBD4_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	66,0
Q96555	ATPase WRNIP1 OS=Homo sapiens GN=WRNIP1 PE=1 SV=2 - [WRIP1_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	72,1
P18074	TFIIH basal transcription factor complex helicase subunit OS=Homo sapiens GN=ERCC2 PE=1 SV=1 - [ERCC2_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	+	+	-	86,9
Q13415	Origin recognition complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=ORC1L PE=1 SV=2 - [ORC1L_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	97,3
P39748	Flap endonuclease 1 OS=Homo sapiens GN=FEN1 PE=1 SV=1 - [FEN1_HUMAN]				Nucleus, mitochondrion	+	+	-	42,6
P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4 - [SAHH_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	47,7
Q98V20	Methylthioribose-1-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=NR11 PE=1 SV=1 - [MTNA_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	-	+	-	39,1
Q53E24	Centrosomal protein of 55 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP55 PE=1 SV=2 - [CEP55_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	54,1
O43482	Protein Msi18 beta OS=Homo sapiens GN=OIP5 PE=1 SV=2 - [MS18B_HUMAN]				Nucleus	+	+	-	24,7
O75449	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1 OS=Homo sapiens GN=KATNA1 PE=1 SV=1 - [KTNA1_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	55,9
Q9UIX2	Cell division cycle protein 23 homolog OS=Homo sapiens GN=CD23 PE=1 SV=3 - [CDC23_HUMAN]				Unknown	+	+	-	68,8
Q9H875	PRKR-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PRKRI1 PE=1 SV=1 - [PKRI1_HUMAN]				Nucleus	+	+	-	21,0
Q5RL73	UPF0712 protein C7orf64 OS=Homo sapiens GN=C7orf64 PE=2 SV=1 - [CG064_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	41,8
Q9UHK0	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=NUPFP1 PE=1 SV=2 - [NUPFP1_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	56,3
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2 - [PAIRB_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	+	+	-	44,9
Q9UIV1	CCR4-NOT transcription complex subunit 7 OS=Homo sapiens GN=CNOT7 PE=1 SV=3 - [CNOT7_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	+	+	-	32,7
Q00178	GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=GTPBP1 PE=1 SV=3 - [GTPB1_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	-	+	-	72,4
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 OS=Homo sapiens GN=MOV10 PE=1 SV=2 - [MOV10_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	+	+	-	113,6
Q14147	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34 OS=Homo sapiens GN=DXH34 PE=2 SV=1 - [DHX34_HUMAN]				Unknown	-	+	-	64,5
Q96P11	Putative methyltransferase NSUNS OS=Homo sapiens GN=NSUNS PE=1 SV=2 - [NSUNS_HUMAN]				Unknown	-	+	-	46,7
O00566	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10 OS=Homo sapiens GN=MPP10 PE=1 SV=2 - [MPP10_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	78,8
Q8IVB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=SRRM1 PE=1 SV=2 - [SRRM1_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	102,3
Q9GJ01	THO complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=THOC3 PE=1 SV=1 - [THOC3_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	38,7
Q9Y310	UPF0027 protein C22orf28 OS=Homo sapiens GN=C22orf28 PE=1 SV=1 - [CV028_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	-	+	-	55,2
Q9BRR8	G patch domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=GPATCH1 PE=1 SV=1 - [GPTC1_HUMAN]				Unknown	+	+	-	103,3
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R5E PE=1 SV=1 - [2ASE_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	54,7
Q13362	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R5C PE=1 SV=3 - [2ASG_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	61,0
Q9UBB4	Ataxin-10 OS=Homo sapiens GN=ATXN10 PE=1 SV=1 - [ATX10_HUMAN]				Cytoplasm	-	+	-	53,5
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G11(G12)/G13(GO) subunit gamma-12 OS=Homo sapiens GN=GNG12 PE=1 SV=3 - [GBG12_HUMAN]				Membrane	+	+	-	8,0
P08173	Muscarinic acetylcholine receptor M4 OS=Homo sapiens GN=CHRM4 PE=2 SV=2 - [ACM4_HUMAN]				Membrane	+	+	-	53,0
P17544	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7 OS=Homo sapiens GN=ATF7 PE=1 SV=2 - [ATF7_HUMAN]				Nucleus, cytoplasm	+	+	-	52,9
Q15014	Mortality factor 4-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=MORF4L2 PE=1 SV=1 - [MOD4L2_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	32,4
Q6P2C8	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 27 OS=Homo sapiens GN=MED27 PE=1 SV=1 - [MED27_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	35,4
Q9BUJ0	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 18 OS=Homo sapiens GN=MED18 PE=1 SV=1 - [MED18_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	23,6
Q13952	Nuclear transcription factor Y subunit gamma OS=Homo sapiens GN=NFYC PE=1 SV=3 - [NFYC_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	50,3
Q715Y5	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25 OS=Homo sapiens GN=MED25 PE=1 SV=2 - [MED25_HUMAN]				Nucleus	-	+	-	78,1



Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 OS=Homo sapiens GN=MED12 PE=1 SV=4 - [MED12_HUMAN]	Transcription	-	+	-	242.9
O95625	Zinc finger and BTB domain-containing protein 11 OS=Homo sapiens GN=ZBTB11 PE=1 SV=2 - [ZBT11_HUMAN]	Transcription	-	+	-	119.3
Q9Y250	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2 OS=Homo sapiens GN=POLR1D PE=1 SV=1 - [RPAC2_HUMAN]	Transcription	+	+	-	15.2
Q8N680	Zinc finger and BTB domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ZBTB2 PE=1 SV=1 - [ZBTB2_HUMAN]	Transcription	+	+	-	57.3
P20719	Homeobox protein Hox-A5 OS=Homo sapiens GN=HOXA5 PE=2 SV=2 - [HXA5_HUMAN]	Transcription	+	+	-	29.3
Q9NPJ6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4 OS=Homo sapiens GN=MED4 PE=1 SV=1 - [MED4_HUMAN]	Transcription	+	+	-	29.7
Q96HR3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30 OS=Homo sapiens GN=MED30 PE=1 SV=1 - [MED30_HUMAN]	Transcription	+	+	-	20.3
Q8N7H5	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog OS=Homo sapiens GN=PAF1 PE=1 SV=2 - [PAF1_HUMAN]	Transcription	+	+	-	59.9
Q14919	Dr1-associated corepressor OS=Homo sapiens GN=DRAP1 PE=1 SV=3 - [NCZA_HUMAN]	Transcription	+	+	-	22.3
Q9ULW3	Activator of basal transcription 1 OS=Homo sapiens GN=ABT1 PE=1 SV=1 - [ABT1_HUMAN]	Transcription	+	+	-	31.1
Q9BT49	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil OS=Homo sapiens GN=WAC PE=1 SV=3 - [WAC_HUMAN]	Transcription	+	+	-	70.7
O95365	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A OS=Homo sapiens GN=ZBTB7A PE=1 SV=1 - [ZBT7A_HUMAN]	Transcription	+	+	-	61.4
O00287	Regulatory factor X-associated protein OS=Homo sapiens GN=RFXAP PE=1 SV=1 - [RFXAP_HUMAN]	Transcription	+	+	-	28.2
P31260	Homeobox protein Hox-A10 OS=Homo sapiens GN=HOXA10 PE=1 SV=2 - [HXA10_HUMAN]	Transcription	+	+	-	40.5
Q9H116	GDNF-inducible zinc finger protein 1 OS=Homo sapiens GN=GZF1 PE=2 SV=1 - [GZF1_HUMAN]	Transcription	-	+	-	80.4
O43298	Zinc finger and BTB domain-containing protein 43 OS=Homo sapiens GN=ZBTB43 PE=1 SV=1 - [ZBT43_HUMAN]	Transcription	-	+	-	52.6
Q02086	Transcription factor Sp2 OS=Homo sapiens GN=SP2 PE=1 SV=3 - [SP2_HUMAN]	Transcription	-	+	-	64.9
Q8IU81	Interferon regulatory factor 2-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IRF2BP1 PE=1 SV=1 - [I2BP1_HUMAN]	Transcription	-	+	-	61.6
Q06547	GA-binding protein subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GABPB1 PE=1 SV=2 - [GABP1_HUMAN]	Transcription	-	+	-	42.5
Q9P2K3	REST corepressor 3 OS=Homo sapiens GN=RCOR3 PE=1 SV=2 - [RCOR3_HUMAN]	Transcription	-	+	-	55.5
Q9HAW0	Transcription factor IIB 50 KDa subunit OS=Homo sapiens GN=BRF2 PE=1 SV=1 - [BRF2_HUMAN]	Transcription	-	+	-	46.5
O75467	Zinc finger protein 324A OS=Homo sapiens GN=ZNF324 PE=1 SV=1 - [Z324A_HUMAN]	Transcription	-	+	-	61.1
P28702	Retinoic acid receptor RXR-beta OS=Homo sapiens GN=RXRB PE=1 SV=2 - [RXRB_HUMAN]	Transcription	-	+	-	56.9
Q03111	Protein ENL OS=Homo sapiens GN=MLLT1 PE=1 SV=2 - [ENL_HUMAN]	Transcription	-	+	-	62.0
Q9Y467	Sai-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=SALL2 PE=1 SV=3 - [SALL2_HUMAN]	Transcription	-	+	-	105.3
Q16670	Zinc finger protein 187 OS=Homo sapiens GN=ZNF187 PE=2 SV=2 - [ZN187_HUMAN]	Transcription	-	+	-	55.2
Q96KM6	Zinc finger protein 512B OS=Homo sapiens GN=ZNF512B PE=1 SV=1 - [Z512B_HUMAN]	Transcription	+	+	-	97.2
O95402	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26 OS=Homo sapiens GN=MED26 PE=1 SV=2 - [MED26_HUMAN]	Transcription	+	+	-	65.4
Q04725	Transducin-like enhancer protein 2 OS=Homo sapiens GN=TL2 PE=1 SV=2 - [TLE2_HUMAN]	Transcription	+	+	-	79.8
Q8TF39	Zinc finger protein 483 OS=Homo sapiens GN=ZNF483 PE=1 SV=3 - [ZN483_HUMAN]	Transcription	+	+	-	85.0
P10244	Myb-related protein B OS=Homo sapiens GN=MYBL2 PE=1 SV=1 - [MYBB_HUMAN]	Transcription	+	+	-	78.7
Q96572	Protein IWS1 homolog OS=Homo sapiens GN=IWS1 PE=1 SV=2 - [IWS1_HUMAN]	Transcription	+	+	-	91.9
Q92618	Zinc finger protein 516 OS=Homo sapiens GN=ZNF516 PE=1 SV=1 - [ZN516_HUMAN]	Transcription	+	+	-	124.2
Q9H2V7	Zinc finger protein 106 homolog OS=Homo sapiens GN=ZFP106 PE=1 SV=1 - [ZF106_HUMAN]	Transcription	-	+	-	208.8
O60244	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 OS=Homo sapiens GN=MED14 PE=1 SV=2 - [MED14_HUMAN]	Transcription	-	+	-	160.5
Q96RN5	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15 OS=Homo sapiens GN=MED15 PE=1 SV=2 - [MED15_HUMAN]	Transcription	-	+	-	86.7
Q7L1Q6	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=BZW1 PE=1 SV=1 - [BZW1_HUMAN]	Transcription, cell cycle	-	+	-	48.0
Q8N1B3	Cyclin-related protein FAM58A OS=Homo sapiens GN=FA58A PE=1 SV=2 - [FA58A_HUMAN]	Transcription, degradation	-	+	-	28.4
Q9NVW2	E3 ubiquitin-protein ligase RLIIM OS=Homo sapiens GN=RLIM PE=1 SV=3 - [RNF12_HUMAN]	Transcription, degradation	-	+	-	68.5
Q96RE7	Nucleus accumbens-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=NACC1 PE=1 SV=1 - [NACC1_HUMAN]	Transcription, degradation	-	+	-	57.2
Q96QR8	Transcriptional activator protein Pur-beta OS=Homo sapiens GN=PURB PE=1 SV=3 - [PURB_HUMAN]	Transcription, RNA biology	+	+	-	33.2
Q8NZW9	E3 SUMO-protein ligase PIAS4 OS=Homo sapiens GN=PIAS4 PE=1 SV=1 - [PIAS4_HUMAN]	Transcription, Signaling	-	+	-	56.5
Q99502	Eyes absent homolog 1 OS=Homo sapiens GN=EYA1 PE=1 SV=2 - [EYA1_HUMAN]	Transcription, Signaling	-	+	-	64.6
Q15760	Probable G-protein coupled receptor 19 OS=Homo sapiens GN=GPR19 PE=2 SV=1 - [GPR19_HUMAN]	Unknown	-	+	-	47.7
Q9Y3C1	Nucleolar protein 16 OS=Homo sapiens GN=NOP16 PE=1 SV=2 - [NOP16_HUMAN]	Unknown	+	+	-	21.2

Q9H0U9	Testis-specific Y-encoded-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TSPLYL1 PE=1 SV=3 - [TSYL1_HUMAN]	Unknown	+	+	-	49.2
Q9UJ43	Putative ribosomal RNA methyltransferase 2 OS=Homo sapiens GN=FTSJ2 PE=1 SV=1 - [RRMJ2_HUMAN]	Unknown	+	+	-	27.4
Q15773	Myeloid leukemia factor 2 OS=Homo sapiens GN=MLF2 PE=1 SV=1 - [MLF2_HUMAN]	Unknown	+	+	-	28.1
Q00532	Cyclin-dependent kinase-like 1 OS=Homo sapiens GN=CDKL1 PE=2 SV=5 - [CDKL1_HUMAN]	Unknown	-	+	-	41.6
Q9HAH7	Probable fibrinogen-1 long transcript protein OS=Homo sapiens GN=FBRS PE=1 SV=2 - [FBSH_HUMAN]	Unknown	+	+	-	38.9
Q96FK6	WD repeat-containing protein 89 OS=Homo sapiens GN=WDR89 PE=1 SV=1 - [WDR89_HUMAN]	Unknown	-	+	-	43.2
Q96N46	Tetrahricopeptide repeat protein 14 OS=Homo sapiens GN=TTCL14 PE=1 SV=1 - [TTCL14_HUMAN]	Unknown	-	+	-	88.3
Q9V2L9	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRCH1 PE=1 SV=2 - [LRCH1_HUMAN]	Unknown	-	+	-	80.8
Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D2 OS=Homo sapiens GN=MAGED2 PE=1 SV=2 - [MAGD2_HUMAN]	Unknown	-	+	-	64.9
Q658V4	Protein FAM9J1A1 OS=Homo sapiens GN=FAM9J1A1 PE=1 SV=3 - [F9J1A1_HUMAN]	Unknown	+	+	-	93.8
Q8N9T8	Protein KRI1 homolog OS=Homo sapiens GN=KRI1 PE=1 SV=2 - [KRI1_HUMAN]	Unknown	+	+	-	83.2
Q9NVR2	Zinc finger CCHC domain-containing protein 15 OS=Homo sapiens GN=ZC3H15 PE=1 SV=1 - [ZC3HF_HUMAN]	Signaling	+	-	-	82.2
Q75525	Protein HIRA OS=Homo sapiens GN=HIRA PE=1 SV=2 - [HIRA_HUMAN]	Transcription	+	-	-	38.8
Q8WU90	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=DRG2 PE=1 SV=1 - [DRG2_HUMAN]	Signaling, cell cycle	+	-	-	48.6
P54198	ATPase family AAA domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ATAD2 PE=1 SV=1 - [ATAD2_HUMAN]	Chromatin regulation, transcription	+	-	-	111.8
Q96GA3	Sister chromatid cohesion protein DCC1 OS=Homo sapiens GN=DSCC1 PE=1 SV=2 - [DCC1_HUMAN]	DNA replication	+	-	-	54.8
Q05D32	Kinesin-like protein KIF2C OS=Homo sapiens GN=KIF2C PE=1 SV=2 - [KIF2C_HUMAN]	Mitosis	+	-	-	53.0
Q96PV6	RNA-binding protein Musashi homolog 1 OS=Homo sapiens GN=MSI1 PE=1 SV=1 - [MS1IH_HUMAN]	RNA biology	+	-	-	86.1
Q8ND83	Ribonuclease P protein subunit p29 OS=Homo sapiens GN=POF4 PE=1 SV=2 - [RPP29_HUMAN]	RNA processing	+	-	-	60.6
Q13310	Forhead box protein P1 OS=Homo sapiens GN=FOXP1 PE=1 SV=1 - [FOXP1_HUMAN]	Transcription	+	+	-	70.7
Q14893	POZ-, AT hook-, and zinc finger-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=PATZ1 PE=1 SV=1 - [PATZ1_HUMAN]	Transcription	+	+	-	31.6
Q9NYP3	Serum response factor-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SRFBP1 PE=1 SV=1 - [SRFB1_HUMAN]	Transcription	+	-	-	61.6
Q92600	Cell cycle regulator Mat89bb homolog OS=Homo sapiens GN=C12orf11 PE=1 SV=2 - [M89BB_HUMAN]	Mitosis, cytoskeleton	+	-	-	33.6
P55039	Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1 - [NUDC_HUMAN]	Mitosis, cytoskeleton	+	-	-	40.7
O60716	PCI domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCID2 PE=1 SV=2 - [PCID2_HUMAN]	Cell cycle	+	-	-	108.1
Q9B5C4	Actin-binding protein anillin OS=Homo sapiens GN=ANLN PE=1 SV=2 - [ANLN_HUMAN]	Cytoskeleton	+	-	-	80.3
Q6PL18	Melanoma-associated antigen G1 OS=Homo sapiens GN=NDNL2 PE=1 SV=1 - [MAGG1_HUMAN]	DNA repair	+	-	-	158.5
Q9BVC3	RecQ-mediated genome instability protein 1 OS=Homo sapiens GN=RM1L PE=1 SV=3 - [RM1L_HUMAN]	DNA replication	+	-	-	44.8
Q99661	Dihydrofolate reductase OS=Homo sapiens GN=DHFR PE=1 SV=2 - [DYR_HUMAN]	Metabolism	+	-	-	81.3
O43347	Separin OS=Homo sapiens GN=ESPL1 PE=1 SV=3 - [ESPL1_HUMAN]	Mitosis	+	-	-	39.1
Q95707	S1 RNA-binding domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SRBD1 PE=1 SV=2 - [SRBD1_HUMAN]	RNA biology	+	-	-	25.4
Q9H334	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=CD2BP2 PE=1 SV=1 - [CD2B2_HUMAN]	RNA splicing	+	-	-	75.3
Q9HBE1	WD repeat-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=WDR6 PE=1 SV=1 - [WDR6_HUMAN]	Signaling	+	-	-	74.0
Q8NEF9	ETS-related transcription factor EIF4 OS=Homo sapiens GN=EIF4 PE=1 SV=1 - [EIF4_HUMAN]	Transcription	+	-	-	48.6
Q9BTD8	Zinc finger homeobox protein 4 OS=Homo sapiens GN=ZFHX4 PE=1 SV=1 - [ZFHX4_HUMAN]	Transcription	+	-	-	50.4
O43818	Synaptogyrin-2 OS=Homo sapiens GN=SYNGR2 PE=1 SV=1 - [SNG2_HUMAN]	Unknown	+	-	-	51.8
Q8NI27	Coiled-coil domain-containing protein 137 OS=Homo sapiens GN=CCDC137 PE=1 SV=1 - [CC137_HUMAN]	Unknown	+	-	-	182.7
Probably specific proteins identified with confidence						
O43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 OS=Homo sapiens GN=PRPF3 PE=1 SV=2 - [PRPF3_HUMAN]	RNA splicing	-	+	-	77.5
O75909	Cyclin-K OS=Homo sapiens GN=CCNK PE=1 SV=2 - [CCNK_HUMAN]	Cell cycle, transcription	-	+	-	64.2
Q9H3P2	Negative elongation factor A OS=Homo sapiens GN=WHSC2 PE=1 SV=3 - [NELFA_HUMAN]	Transcription	-	+	-	57.2
Q8WX92	Negative elongation factor B OS=Homo sapiens GN=COBRA1 PE=1 SV=1 - [NELFB_HUMAN]	Transcription	-	+	-	65.7
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Homo sapiens GN=CNP PE=1 SV=2 - [CN37_HUMAN]	RNA biology, cytoskeleton	-	+	-	47.5
O60216	Double-strand-break repair protein rad21 homolog OS=Homo sapiens GN=RAD21 PE=1 SV=2 - [RAD21_HUMAN]	Chromatin regulation, DNA repair	+	+	-	71.6

P06660:P60661	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2 - [MYL6_HUMAN]			Cytoskeleton	+	+	-	Cytoplasm	16,9
Q9GC36	Pyroline-5-carboxylate reductase 2 OS=Homo sapiens GN=PYCR2 PE=1 SV=1 - [PYCR2_HUMAN]			Metabolism	+	+	-	Cytoplasm	33,6
Q6P2E9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4 OS=Homo sapiens GN=EDC4 PE=1 SV=1 - [EDC4_HUMAN]			RNA biology	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	151,6
P14859	POU domain, class 2, transcription factor 1 OS=Homo sapiens GN=POUF1 PE=1 SV=2 - [PO2F1_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	76,4
Q9P031	Thyroid transcription factor 1-associated protein 26 OS=Homo sapiens GN=CCDC59 PE=1 SV=2 - [TAP26_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	28,7
A0AVF1	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52 OS=Homo sapiens GN=DDX52 PE=1 SV=3 - [DDX52_HUMAN]			RNA biology	+	-	-	Nucleus	64,1
Q9Y3L3	Paired amphipathic helix protein Sin3a OS=Homo sapiens GN=SIN3A PE=1 SV=2 - [SIN3A_HUMAN]			Transcription	+	-	-	Nucleus	75,7
Q96MG7	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=RPRD2 PE=1 SV=1 - [RPRD2_HUMAN]			Unknown	+	-	-	Unknown	34,3
Q14674	Rac GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RACGAP1 PE=1 SV=1 - [RGAP1_HUMAN]			Cytoskeleton	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	233,0
Q95400	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 OS=Homo sapiens GN=GNAI3 PE=1 SV=2 - [GNAI3_HUMAN]			Signaling	+	-	-	Membrane	37,6
P16383	Proline-rich protein PRCC OS=Homo sapiens GN=PRCC PE=1 SV=1 - [PRCC_HUMAN]			Cell cycle	+	-	-	Nucleus	89,3
Q99607	Replication factor C subunit 5 OS=Homo sapiens GN=RFC5 PE=1 SV=1 - [RFC5_HUMAN]			DNA replication	+	-	-	Nucleus	70,7
Q86UP3	Cleavage stimulation factor subunit 3 OS=Homo sapiens GN=CSTF3 PE=1 SV=1 - [CSTF3_HUMAN]			RNA processing	+	-	-	Nucleus	393,5
Q43760	Caprin-1 OS=Homo sapiens GN=CAPRN1 PE=1 SV=2 - [CAPRL_HUMAN]			RNA biology	+	-	-	Nucleus, cytoplasm	24,8
P16401	Catenin delta-1 OS=Homo sapiens GN=CTNND1 PE=1 SV=1 - [CTND1_HUMAN]			Signaling	+	-	-	Nucleus, cytoplasm	22,6
O95251	Gem-associated protein 5 OS=Homo sapiens GN=GEMIN5 PE=1 SV=3 - [GEMIS_HUMAN]			RNA splicing	+	-	-	Nucleus	70,6
P30876	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 OS=Homo sapiens GN=DDX56 PE=1 SV=1 - [DDX56_HUMAN]			RNA processing	+	-	-	Nucleus	133,8
Q9BXV9	Fanconi anemia group D2 protein OS=Homo sapiens GN=FANCD2 PE=1 SV=1 - [FACD2_HUMAN]			DNA repair	-	+	-	Nucleus	166,4
Q9NVN8	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein OS=Homo sapiens GN=GNL3L PE=1 SV=1 - [GNL3L_HUMAN]			RNA processing, Mitosis	+	+	-	Nucleus	65,5
Q9NVU7	Protein SDA1 homolog OS=Homo sapiens GN=SDA1 PE=1 SV=2 - [SDA1_HUMAN]			RNA biology	-	+	+	Nucleus	79,8
P50148;Q2829;	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha OS=Homo sapiens GN=GNAQ PE=1 SV=4 - [GNAQ_HUMAN]			Signaling	+	+	+	Nucleus, membrane	42,1
Q9UNY4	Transcription termination factor 2 OS=Homo sapiens GN=TTF2 PE=1 SV=2 - [TTF2_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	129,5
Q5C9Z4	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=NOM1 PE=1 SV=1 - [NOM1_HUMAN]			RNA biology	+	+	-	Nucleus	96,2
Q9BXF3	Cat eye syndrome critical region protein 2 OS=Homo sapiens GN=CECR2 PE=1 SV=2 - [CECR2_HUMAN]			Chromatin regulation, mitosis	+	+	-	Unknown	164,1
Q6ZW49	PAX-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PAXIP1 PE=1 SV=1 - [PAXIL_HUMAN]			DNA repair, chromatin regulation	+	+	-	Nucleus	117,6
Q05048	Cleavage stimulation factor subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CSTF1 PE=1 SV=1 - [CSTF1_HUMAN]			RNA biology	-	+	+	Nucleus	48,3
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=1 - [C1QB_P_HUMAN]			RNA splicing, transcription	-	+	+	Nucleus, cytoplasm, secre	31,3
Q9NVG6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17 OS=Homo sapiens GN=MED17 PE=1 SV=1 - [MED17_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	72,8
P05549	Transcription factor AP-2-alpha OS=Homo sapiens GN=TFAP2A PE=1 SV=1 - [AP2A_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	48,0
Q9NSI2	Uncharacterized protein C2Jorf70 OS=Homo sapiens GN=C2Jorf70 PE=1 SV=2 - [CU070_HUMAN]			Unknown	+	+	-	Unknown	25,4
Q9NR29	Lymphoid-specific helicase OS=Homo sapiens GN=HELLS PE=1 SV=1 - [HELLS_HUMAN]			Chromatin regulation	+	+	+	Nucleus	97,0
P06400	Retinoblastoma-associated protein OS=Homo sapiens GN=RB1 PE=1 SV=2 - [RB_HUMAN]			Cell cycle, signaling, chromatin regulation	+	+	-	Nucleus	106,1
Q9HC52	Chromobox protein homolog 8 OS=Homo sapiens GN=CBX8 PE=1 SV=3 - [CBX8_HUMAN]			Chromatin regulation	+	+	-	Nucleus	43,4
Q15291	Retinoblastoma-binding protein 5 OS=Homo sapiens GN=RBBP5 PE=1 SV=2 - [RBBP5_HUMAN]			Chromatin regulation, transcription	+	+	-	Nucleus	59,1
Q9BZ95	Histone-lysine N-methyltransferase NSD3 OS=Homo sapiens GN=WHSC1LL1 PE=1 SV=1 - [NSD3_HUMAN]			Chromatin regulation, transcription	+	+	-	Nucleus	161,5
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LIDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]			Metabolism	-	+	+	Cytoplasm	36,7
Q86V91	Kinesin-like protein KIF18B OS=Homo sapiens GN=KIF18B PE=1 SV=2 - [K18B_HUMAN]			Mitosis, cytoskeleton	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	92,1
Q9GZR2	RNA exonuclease 4 OS=Homo sapiens GN=REXO4 PE=1 SV=2 - [REXO4_HUMAN]			RNA biology	-	+	+	Nucleus	46,6
Q9NVW4	Cell division protein kinase 12 OS=Homo sapiens GN=CDK12 PE=1 SV=1 - [CDK12_HUMAN]			RNA splicing	+	+	-	Nucleus	164,1
Q8WXD5	Gem-associated protein 6 OS=Homo sapiens GN=GEMIN6 PE=1 SV=1 - [GEMI6_HUMAN]			RNA splicing	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	18,1
P19784	Casein kinase II subunit alpha' OS=Homo sapiens GN=CSNK2A2 PE=1 SV=1 - [CSK22_HUMAN]			Signaling, cell cycle, mitosis	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	41,2
Q9Y3C7	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31 OS=Homo sapiens GN=MED31 PE=1 SV=1 - [MED31_HUMAN]			Transcription	+	+	+	Nucleus	15,8
O75448	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24 OS=Homo sapiens GN=MED24 PE=1 SV=1 - [MED24_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	110,2
Q96JP5	Zinc finger protein 91 homolog OS=Homo sapiens GN=ZFP91 PE=1 SV=1 - [ZFP91_HUMAN]			Transcription	+	+	-	Nucleus	63,4
Q9UFC0	Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRWD1 PE=1 SV=2 - [LRWD1_HUMAN]			Mitosis, chromatin regulation	+	+	-	Nucleus, cytoplasm	70,8

[illegible]

Anexo 7. Proteínas que interaccionan con Sur8 en RT112 FGFR1

Accession	Description	Function	Location	Sequest	Mascot
Specific proteins identified with confidence					
Q9UQL3	Leucine-rich repeat protein SHOC-2 OS=Homo sapiens GN=SHOC2 PE=1 SV=2 - [SHOC2_HUMAN]	TARGET  RNA splicing & processing RNA splicing & processing, Translation RNA splicing & processing RNA splicing & processing RNA splicing & processing RNA splicing & processing RNA splicing & processing RNA splicing & processing Transcription Unknown Unknown RNA splicing & processing RNA splicing & processing RNA splicing & processing DNA repair, Transcription Cell cycle regulation Unknown Cell adhesion Cell cycle regulation Signaling, Cytoskeleton Transcription Unknown Unknown Unknown	Nucleus, cytoplasm	+	+
Q69YN4-4	Isoform 4 of Protein virilizer homolog OS=Homo sapiens GN=KIAA1429 - [VIR_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q92879-5	Isoform 5 of CUGBP Elav-like family member 1 OS=Homo sapiens GN=CELF1 - [CELF1_HUMAN]		Nucleus, cytoplasm	+	+
Q6NXC1	Epithelial-RNA splicing & processing regulatory protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ESRP1 PE=4 SV=1 - [HOYBR2_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q15427	RNA splicing & processing factor 3B subunit 4 OS=Homo sapiens GN=SF3B4 PE=1 SV=1 - [SF3B4_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q15428	RNA splicing & processing factor 3A subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SF3A2 PE=4 SV=1 - [K7EP23_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q15393	RNA splicing & processing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens GN=SF3B3 PE=1 SV=4 - [SF3B3_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Homo sapiens GN=DDX50 PE=1 SV=1 - [DDX50_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q01664	Transcription factor AP-4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TFAP4 PE=2 SV=1 - [J3L254_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q96LP6	Uncharacterized protein C12orf42 OS=Homo sapiens GN=C12orf42 PE=2 SV=1 - [F8VX61_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q4VC44-2	Isoform 2 of FLVWCH-type zinc finger-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=FLVWCH1 - [FWCH1_HUMAN]		Unknown	+	-
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRN200 PE=1 SV=2 - [US20_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q87EQ6	Gem-associated protein 5 OS=Homo sapiens GN=GEMIN5 PE=1 SV=3 - [GEMIN5_HUMAN]		Nucleus	+	+
Q43172-2	Isoform 2 of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4 OS=Homo sapiens GN=PRP4 - [PRP4_HUMAN]		Nucleus	+	-
Q96RL1	BRCA1-A complex subunit RAP80 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UIMC1 PE=2 SV=1 - [D6RC40_HUMAN]		Nucleus	+	+
P51610-2	Isoform 2 of Host cell factor 1 OS=Homo sapiens GN=HCFC1 - [HCFC1_HUMAN]	Nucleus	+	+	
Q9Y5A9-2	Isoform 2 of YTH domain family protein 2 OS=Homo sapiens GN=YTHDF2 - [YTHD2_HUMAN]	Nucleus	+	+	
P05556	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2 - [ITB1_HUMAN]	Cell cycle regulation	nucleus, cytoplasm	+	+
Q6ZVX7	Non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 homolog OS=Homo sapiens GN=NCCRP1 PE=1 SV=1 - [NCRP1_HUMAN]	Unknown	Unknown	+	+
Q12929	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 OS=Homo sapiens GN=EPS8 PE=1 SV=1 - [EPS8_HUMAN]	Cell adhesion	Plasm membrane	-	+
P41223	Protein BUD31 homolog OS=Homo sapiens GN=BUD31 PE=1 SV=2 - [BUD31_HUMAN]	Cell cycle regulation	Cytoplasm	-	+
Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 OS=Homo sapiens GN=SART3 PE=1 SV=1 - [SART3_HUMAN]	Signaling, Cytoskeleton	Cytoplasm	-	+
Q8N3X1	Formin-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=FNBP4 PE=1 SV=2 - [FNBP4_HUMAN]	Transcription	Nucleus	-	+
Q9Y520	Protein BAT2-like 2 OS=Homo sapiens GN=BAT2L2 PE=1 SV=2 - [BA2L2_HUMAN]	Unknown	Cytoplasm	-	+
		Unknown	Nucleus	-	+
			Unknown	-	+
Probably specific proteins identified with confidence					
Q15398	Disks large-associated protein 5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DLGAP5 PE=2 SV=1 - [G3V4E5_HUMAN]	Cell cycle regulation	Nucleus, cytoplasm	+	+
Q6PJ77-4	Isoform 4 of Zinc finger CCH1 domain-containing protein 14 OS=Homo sapiens GN=ZC3H14 - [ZC3HE_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRPF_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=4 SV=1 - [HOYB39_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
Q43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 OS=Homo sapiens GN=PRPF3 PE=2 SV=1 - [E7EVD1_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
Q12996	Cleavage stimulation factor subunit 3 OS=Homo sapiens GN=CSTF3 PE=1 SV=1 - [CSTF3_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
Q97797	Symplekin OS=Homo sapiens GN=SYMPK PE=1 SV=2 - [SYMPK_HUMAN]	RNA splicing & processing, Tight junctions	Nucleus, cytoplasm	+	+
Q9B777	Polymerase delta-interacting protein 3 OS=Homo sapiens GN=POLDIP3 PE=1 SV=2 - [PDIP3_HUMAN]	RNA splicing & processing, Translation	Nucleus	+	+
Q13148	TAR DNA-binding protein 43 OS=Homo sapiens GN=TARDBP PE=1 SV=1 - [TADBP_HUMAN]	Transcription, RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
Q96A24	Far upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=FUBP3 PE=1 SV=2 - [FUBP3_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+
PI3010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3 - [XRCC5_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+	+
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 - [AHNK_HUMAN]	Unknown	Nucleus	+	+
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4 - [NONO_HUMAN]	DNA repair, transcription, RNA splicing & processing	Nucleus	+	+
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=U2AF2 PE=1 SV=4 - [U2AF2_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	-	+
Q14690	Protein RRP5 homolog OS=Homo sapiens GN=PDCD11 PE=1 SV=3 - [RRP5_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	-	+
Q96737	Putative RNA-binding protein 15 OS=Homo sapiens GN=RBM15 PE=1 SV=2 - [RBM15_HUMAN]	Transcription	Nucleus	-	+
Q9BTC0	Death-inducer obliterator 1 OS=Homo sapiens GN=DIDO1 PE=1 SV=5 - [DIDO1_HUMAN]	Transcription	Nucleus, cytoplasm	-	+
Q9BYG3	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein OS=Homo sapiens GN=MKI67IP PE=1 SV=1 - [MK67I_HUMAN]	Unknown	Nucleus	-	+



QZ7SL9-2	Isoform 2 of Interferon regulatory factor 2-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=IRF2BP2 - [ZBP2_HUMAN]	Transcription	Nucleus, cytoplasm	+
Q9HCU9	Breast cancer metastasis-suppressor 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BRMS1 PE=2 SV=4 - [EPJF5_HUMAN]	Transcription	Nucleus, cytoplasm	+
Q9Y2H1	Serine/threonine-protein kinase 38-like (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STK38L PE=2 SV=1 - [F5H277_HUMAN]	Unknown	Cytoplasm	+
Q9H147	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DNTIP1 PE=4 SV=1 - [H7C1J2_HUMAN]	Unknown	Nucleus	+
Q8N9W8-2	Isoform 2 of Protein FAM71D OS=Homo sapiens GN=FAM71D - [FA71D_HUMAN]	Unknown	Nucleus	+
Q9BTD8	RNA-binding protein 42 OS=Homo sapiens GN=RBM42 PE=4 SV=1 - [K7ER08_HUMAN]	Unknown	Nucleus, cytoplasm	+
Q96PB1	CAS1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=CASD1 PE=2 SV=1 - [CASD1_HUMAN]	Unknown	Nucleus, cytoplasm	+
Q86YM6	MBNL1 protein OS=Homo sapiens GN=MBNL1 PE=2 SV=1 - [Q86YM6_HUMAN]	Unknown	Plasm membrane	+
Q8TCE6	Protein FAM45A OS=Homo sapiens GN=FAM45A PE=2 SV=1 - [B4DMU4_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q5T280	Uncharacterized protein C9orf114 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=C9orf114 PE=4 SV=1 - [R4NGG4_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q5TAL2	U1 small nuclear ribonucleoprotein C OS=Homo sapiens GN=SNRPC PE=2 SV=1 - [Q5TAL2_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q6Z5T8	Putative uncharacterized protein encoded by LINC00610 OS=Homo sapiens GN=LINC00610 PE=2 SV=1 - [CK055_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q9UPE1	SRF5 protein kinase 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SRPK3 PE=4 SV=1 - [H7C212_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q9H0A9	Sperlinin-like protein OS=Homo sapiens GN=SPATC1L PE=2 SV=3 - [SPC1L_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q95999	B-cell lymphoma/leukemia 10 OS=Homo sapiens GN=BCL10 PE=1 SV=1 - [BCL10_HUMAN]	Apoptosis	Cytoplasm	+
Q9HB09	Bcl-2-like protein 12 OS=Homo sapiens GN=BCL2L12 PE=1 SV=1 - [B2L12_HUMAN]	Apoptosis	Unknown	+
Q9P273	Teneurin-3 OS=Homo sapiens GN=OD23 PE=2 SV=3 - [TEN3_HUMAN]	Apoptosis	Unknown	+
Q9NP98	Myozenin-1 OS=Homo sapiens GN=MYOZ1 PE=1 SV=1 - [IMYOZ1_HUMAN]	Cell adhesion	Plasm membrane	+
Q15052	Rho guanine nucleotide exchange factor 6 OS=Homo sapiens GN=ARHGE6 PE=1 SV=2 - [ARHGG_HUMAN]	Cytoskeleton	Nucleus, cytoplasm	+
Q9UKX3	Myosin-13 OS=Homo sapiens GN=MYH13 PE=1 SV=1 - [MYH13_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	+
Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 OS=Homo sapiens GN=USP7 PE=1 SV=2 - [UBP7_HUMAN]	Cytoskeleton	Cytoplasm	+
Q96019	Actin-like protein 6A OS=Homo sapiens GN=ACTL6A PE=1 SV=1 - [ACLEA_HUMAN]	DNA repair	Nucleus, cytoplasm	+
P25205	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens GN=MCM3 PE=1 SV=3 - [MCM3_HUMAN]	DNA replication	Nucleus	+
Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4 OS=Homo sapiens GN=LILRB4 PE=1 SV=2 - [LIRB4_HUMAN]	Immune system	Plasm membrane	+
O43818	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=RRP9 PE=1 SV=1 - [U3IP2_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+
Q9HCS7	Pre-mRNA-splicing factor SYF1 OS=Homo sapiens GN=XAB2 PE=1 SV=2 - [SYF1_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+
Q9P210	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPSF2 PE=1 SV=2 - [CPSF2_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus	+
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Homo sapiens GN=UPF1 PE=1 SV=2 - [RENT1_HUMAN]	RNA splicing & processing	Nucleus, cytoplasm	+
Q00144	Fizzled-9 OS=Homo sapiens GN=FZD9 PE=2 SV=1 - [FZD9_HUMAN]	Signaling	Plasm membrane	+
O15357	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2 OS=Homo sapiens GN=INPPL1 PE=1 SV=2 - [SHIP2_HUMAN]	Signaling	Cytoplasm	+
Q96K30	Uncharacterized protein C12orf52 OS=Homo sapiens GN=C12orf52 PE=2 SV=1 - [CU052_HUMAN]	Signaling, Cytoskeleton	Nucleus, cytoplasm	+
Q9P1U0	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12 OS=Homo sapiens GN=ZNRD1 PE=1 SV=1 - [RPA12_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q8TF68	Zinc finger protein 384 OS=Homo sapiens GN=ZNF384 PE=1 SV=1 - [ZN384_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q14241	Zinc finger protein 174 OS=Homo sapiens GN=ZNF174 PE=1 SV=1 - [ZN174_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q15697	Zinc finger protein 26 OS=Homo sapiens GN=ZNF26 PE=2 SV=3 - [ZNF26_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
P17031	Bromodomain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=BRD3 PE=1 SV=1 - [BRD3_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q15059	General transcription factor 3C polypeptide 2 OS=Homo sapiens GN=GTF3C2 PE=1 SV=2 - [TF3C2_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q8WU44	PR domain zinc finger protein 1 OS=Homo sapiens GN=PRDM1 PE=1 SV=1 - [PRDM1_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
O75626	Sal-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=SALL2 PE=1 SV=3 - [SALL2_HUMAN]	Transcription	Nucleus, cytoplasm	+
Q9Y467	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A OS=Homo sapiens GN=RPORD1A PE=1 SV=1 - [RPRIA_HUMAN]	Transcription	Nucleus	+
Q96P16	WD repeat-containing protein 18 OS=Homo sapiens GN=WDRL8 PE=1 SV=2 - [WDR18_HUMAN]	Transcription, Cell cycle regulation	Nucleus	+
Q9BV38	Protein FAM98A OS=Homo sapiens GN=FAM98A PE=1 SV=1 - [FA98A_HUMAN]	Transcription, Cell cycle regulation	Nucleus, cytoplasm	+
Q8NC45	SPAT52-like protein OS=Homo sapiens GN=SPAT52L PE=1 SV=2 - [SP52L_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q9NUO6	Uncharacterized protein C4orf29 OS=Homo sapiens GN=C4orf29 PE=1 SV=1 - [C0029_HUMAN]	Unknown	Nucleus, cytoplasm	+
Q9P651	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5 OS=Homo sapiens GN=PLEKHA5 PE=1 SV=1 - [PKHA5_HUMAN]	Unknown	Unknown	+
Q9HAU0	Probable G-protein coupled receptor 158 OS=Homo sapiens GN=GPR158 PE=1 SV=1 - [GP158_HUMAN]	Unknown	Cytoplasm	+
Q5T848	Uncharacterized protein KIA0556 OS=Homo sapiens GN=KIA0556 PE=1 SV=4 - [K0556_HUMAN]	Unknown	Plasm membrane	+
Q60303		Unknown	Unknown	+





